

Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Chlorella aus standardisierten Fermenterkulturen

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorella

Vorgelegt

von

Diether Kersch

aus

Bukarest

U N T E R S U C H U N G E N Ü B E R D I E
I N H A L T S S T O F F E V O N C H L O R E L L A
A U S S T A N D A R D I S I E R T E N
F E R M E N T E R K U L T U R E N

Ein Beitrag zur Taxonomie der Gattung Chlorella

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Diether Kersch
aus Bukarest



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24. NOV. 1976

Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. H. Remmert
Erstberichterstatter:	Professor Dr. E. Kessler
Zweitberichterstatter:	Professor Dr. W. Haupt

Abkürzungen

C.	= Chlorella
Chl.	= Chlorophyll
FG	= Frischgewicht
FID	= Flammenionisationsdetektor
GC	= Gaschromatograph Gaschromatogramm
KW	= Kohlenwasserstoff
MS	= Massenspektroskopie Massenspektrogramm
MG	= Molekulargewicht
NM	= Nährmedium
OD	= optische Dichte
pg	= Pikogramm (10^{-9} g)
TG	= Trockengewicht
TIC	= Totalionenstrom-Chromatogramm
TMS	= Trimethylsilyl-Verbindung
tr	= Retentionszeit
ZZ	= Zellzahl

Inhaltsverzeichnis

=====

I	EINLEITUNG	1
II	MATERIAL UND METHODEN	3
	1) Untersuchte Algen und Anzuchtbedingungen	3
	2) Meßmethoden	4
	3) Ernte und Extraktion der Algen	5
	4) Untersuchung des Algenextraktes	6
	a) Gaschromatographie	6
	b) Koppelung Gaschromatographie- Massenspektrometrie	7
III	ERGEBNISSE	9
	1) Algenwachstum	9
	a) Vermehrung der Algen	9
	b) pH-Veränderungen	10
	c) Trockengewicht	11
	d) Chlorophyllgehalt	12
	2) Algenextrakt	18
	3) Gaschromatographie	19
	4) Massenspektrometrie	30
IV	DISKUSSION	60
V	ZUSAMMENFASSUNG	73
VI	LITERATUR	75

I EINLEITUNG

Einzellige Grünalgen kommen weltweit vor, sind relativ anspruchslos und lassen sich daher leicht im Labor kultivieren. Als photoautotrophe Organismen benötigen sie zum Leben Wasser, anorganische Salze, Licht und CO_2 . Sie vermehren sich um das 2^n -fache pro Zellteilung und sind häufig asexuell. Da sich alle physiologischen und biochemischen Reaktionen in einer einzigen selbständigen Zelle abspielen, waren die Algen - besonders Chlorella - bald ein beliebtes Versuchsobjekt der Physiologen. Viele Forscher verwendeten für ihre Untersuchungen Algen, die in der Umgebung ihrer Arbeitsstätte gesammelt und in dem jeweiligen Institut weiter kultiviert wurden. Grundlegende Arbeiten mit Chlorella, etwa von Chodat oder Meyer, geben keine näheren Beschreibungen der dabei verwendeten Spezies, so daß spätere Versuche nicht immer identische Ergebnisse brachten. Im Laufe der Jahre entstanden Algensammlungen, unter anderen in Göttingen, Bloomington, Cambridge und Prag, mit eigenen Stammbezeichnungen. Das führte dazu, daß der gleiche Stamm verschiedene Bezeichnungen hatte (*C. vulgaris* forma *tertia*: Göttingen -211-11d, Bloomington -261, Cambridge - Stamm 1). Andererseits gab man auch zwei verschiedenen Stämmen die selbe Ziffer (*C. homosphaera* 211-8e in Cambridge, *C. fusca* 211-8e in Göttingen). Es wurden rund 50 verschiedene Taxa der Gattung beschrieben. In den sechziger Jahren bemühten sich dann mehrere Gruppen, durch ein einheitliches System Ordnung in die Vielfalt der vorhandenen Stämme zu bringen. KESSLER et al. (1963), KESSLER (1967), KESSLER et al. (1968), KESSLER und ZWEIER (1971), KESSLER (1974), HELLMANN und KESSLER (1974), VINAYAKUMAR und KESSLER (1975), SHIHIRA und KRAUSS (1965) und DaSILVA

und GYLLENBERG (1972) unternahmen den Versuch, die Chlorellataxa anhand physiologischer und biochemischer Kriterien gegeneinander abzugrenzen. FOTT und NOVAKOVA (1969) teilten die Arten und Atämme aufgrund morphologischer Unterschiede in 10 Taxa ein. Je ursprünglicher, d.h. genetisch am stärksten fixiert, ein Merkmal ist, desto mehr Gewicht muß ihm beigemessen werden.

Hierzu gehören die DNS - Zusammensetzung (HELLMANN und KESSLER (1974)), die Hydrogenase - Aktivität (KESSLER et al. (1963)) und immunologische Reaktionen. Genauso wertvoll sind aber auch Merkmale, die als Reaktion auf Einflüsse von außen zustande kommen (Sekundär - Carotinoid - Bildung (KESSLER et al. (1963)), Chlorophyllgehalt oder Inhaltsstoffe), wenn bei der Algenanzucht alle Parameter konstant gehalten werden. Für das Gebiet der Algenlipide meldet daher WOOD (1974) Zweifel an vielen Publikationen an, da seiner Ansicht nach die Ergebnisse von Algen stammen, deren Wachstumsbedingungen nicht definiert waren. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit großer Wert auf die Konstanz der Wachstumsbedingungen gelegt. Durch die Einführung von neun neuen Merkmalen sollte sowohl der Grad der Übereinstimmung innerhalb des bestehenden Systems erweitert als auch die Charakterisierung der einzelnen Stämme verbessert werden.

II MATERIAL und METHODEN

1) Untersuchte Algen und Anzuchtbedingungen

In dieser Arbeit werden die 88 Stämme von *Chlorella* untersucht, die bei KESSLER (1967), KESSLER et al. (1968) und KESSLER und ZWEIER (1971) beschrieben sind. Die sterile Anzucht erfolgte in Fermentern der Fa. B. Braun Melsungen (KERSCH 1972). Dabei wurden folgende Bedingungen eingehalten:

- die Menge des eingesetzten Nährmediums betrug 8-9 l.
- das NM wurde konstant auf 25 °C gehalten, obwohl für *C. sorokiniana* (früher *C. vulgaris* forma *tertia*) bei KESSLER (1972) eine höhere optimale Wachstumstemperatur angegeben ist.
- die Rührer drehten sich mit 1000 U/min, bei schaumbildenden Formen entsprechend langsamer.
- die Kulturen wurden mit 10 l Luft pro min, der 1% CO₂ zugemischt war, begast und mit
- Dauerlicht von ca. 10 klux bestrahlt.

Eine Ausnahme bildeten die Algen der Art *C. vulgaris*, die mit einem Sternchen gekennzeichnet sind. Sie wurden im 5 l Rundkolben bei 25 °C, ca. 4000 lux Dauerlicht und 1,5% CO₂ zur Preßluft angezogen. Parallel dazu wuchsen die gleichen Algen zur Bestimmung der Wachstumsparameter im Lichtthermostat der Fa. Kniese (beschrieben bei KUHLE und LORENZEN (1964)). In Vorversuchen hatte ich geklärt, daß keine signifikanten Unterschiede im Wachstum und im physiologischen Zustand der Algen im Lichtthermostaten und im Fermenter auftraten.

Die Kultur erfolgte im Nährmedium nach KESSLER und CZYGAN (1970), für *C. protothecoides* nach KESSLER und ZWEIER (1971), für *C. minutissima* C-1.1.9 und *C. sorokiniana* 211-18 nach KESSLER und CZYGAN (1970) unter

Zusatz von 0,2% Hefeextrakt (Merck). Alle Chemikalien waren p.a. und wurden als Konzentrate in aqua bidest. angesetzt. Die Organismen stammten aus der Algensammlung Pringsheim in Göttingen und werden in unserem Institut auf Schrägagar weitergezogen. Die Fermenter wurden mit einer Vorkultur so angeimpft, daß die Ausgangsdichte ca. 10^7 Zellen pro ml betrug.

2) Meßmethoden

Aus dem Fermenter wurden jeden Tag steril Proben entnommen und durch folgende Messungen das Wachstum und der physiologische Zustand der Algen untersucht:

- pH des Nährmediums,
- Trübung der Suspension im Photometer bei 750 nm,
- Zellzahl pro ml in der Zählkammer nach Neubauer,
- Frischgewicht durch 5-minütiges Absaugen von 50 ml Suspension auf ein Membranfilter mit $0,6 \mu$ Porendurchmesser (Sartorius) und Subtraktion von 158 mg Wasseranteil des Filters.
- Trockengewicht durch Auswägen des Filters nach zweistündigem Trocknen bei 105°C im Trockenschrank und anschließendem Abkühlen im Exsikkator,
- Chlorophyllgehalt in Methanol nach BÖGER (1964) und GRIMME und BOARDMAN (1972).

Um etwaige Meßfehler auszuschalten, ließen sich Parallelversuche nicht umgehen. Dies geschah bei der Bestimmung der Zellzahl, indem 4 mal 16 Großquadrate ausgezählt wurden, wenn die Differenz zwischen den einzelnen Werten nicht größer als 20% war. Dichte Suspensionen verdünnte ich entsprechend. Bei der Chlorophyllbestimmung wurden zwei Ansätze je zwei mal im Photometer gemessen und daraus der Mittelwert errechnet. Wichen die Ansätze um mehr als 10% voneinander ab, wiederholte ich den Versuch. Bei hohen Chlorophyllkonzentrationen wurde der Extrakt so verdünnt, daß er in einem Meßbereich zwischen 0,08 und 0,75 lag.

Die Algen der Vorkulturen vermehrten sich exponentiell und setzten ihr Wachstum im Fermenter in gleicher Weise fort, ohne eine Adaptationsphase zu durchlaufen, bis sie nach einer stammspezifischen Zeit, durch äußere Umstände veranlaßt, ihre Vermehrungsrate verringerten und schließlich ganz einstellten. Dieses exponentielle Wachstum erscheint im halblogarithmischen Maßstab (Abszisse linear, Anzahl der Tage; Ordinate logarithmisch, Zellzahl pro ml) als Gerade und läßt sich nach FOTT (1971) aus folgender Gleichung errechnen:

$$k' = \log \frac{N}{N_0} : t$$

wobei N_0 die Zahl der Zellen pro ml zu Beginn, N die Zellzahl am Ende der log - Phase und t die Anzahl der Tage bedeutet. k' gibt im halblogarithmischen Maßstab die Steigung der Geraden an, während sich aus N/N_0 der Wert für die Vervielfachung der Population im gemessenen Zeitraum errechnet.

3) Ernte und Extraktion der Algen

Verringerte sich die Zuwachsrates derart, daß die Wachstumskurve aus der linearen Steigung in die stationäre Phase überging, so wurden die Algen in der Durchlaufzentrifuge (Wkf G 50 K) bei 10 000 U/min und 4 °C vom NM getrennt, anschließend zweimal mit aqua dest. gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung im Tiefkühlschrank bei -26 °C aufbewahrt.

Zwei Stunden vor der Weiterverwendung habe ich die eingefrorenen Algen bei Zimmertemperatur aufgetaut, mit einem halben Liter aqua dest. in einen Rundkolben übergeführt und in einer modifizierten Karlsruher Apparatur (beschrieben bei STAHL und YORK (1967)) drei Stunden extrahiert, abgeändert nach DAB 7 (1967). In der Vorlage der Karlsruher Apparatur befanden sich 2 ml n-

Hexan; den darin aufgefangenen Originalextrakt untersuchte ich ohne weitere Behandlung gaschromatographisch und massenspektroskopisch. Die Extrakte wurden ebenfalls bei -26°C aufbewahrt.

4) Untersuchung des Algenextraktes

a) Gaschromatographie:

Die Trennung des Originalextraktes erfolgte in einem Gaschromatographen der Fa. Carlo Erba. Die Glassäule war 2 m lang, mit einem Innendurchmesser (ID) von 3 mm und wurde von mir selbst mit Gaschrom Q gepackt, das mit 3% SE-30 imprägniert ist (Serva Heidelberg) und eine Körnung von 125 - 250 μ hat. Der Gasdurchfluß betrug 26 ml/min, die Injektortemperatur 300°C . Das Temperaturprogramm erstreckte sich von 50°C bis 280°C bei 5°C pro min. Als Trägergas diente nachgereinigter Stickstoff, als Brenngase Wasserstoff und nachgereinigte synthetische Luft (Fa. Linde). Die apparativen Parameter (Verstärkung, Schreibervorschub) blieben bei allen Temperaturen gleich.

Die Einspritzmenge betrug jeweils 2 μl des Originalextraktes. Waren die Schreiberausschläge zu gering, so wurde das n-Hexan vorsichtig mit Stickstoff abgeblasen, bis die Lösung eine geeignete Konzentration aufwies. Die Identifizierung der einzelnen Alkane erfolgte anhand eines Gemisches authentischer n-Alkane (Fluka) zwischen n-Tridecan ($\text{n-C}_{13}\text{H}_{28}$) bis Tricosan ($\text{n-C}_{23}\text{H}_{48}$), indem diese zum Originalextrakt zugespritzt oder getrennt durch die Retentionszeit (t_r) verglichen wurden. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach KAISER (1965/1973).

Das Lösungsmittel n-Hexan wurde getrennt gaschromatographisch untersucht, um ein Verschleppen von Verunreinigungen in den Extrakt auszuschließen.

b) Koppelung Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

Verwendet wurde die GC-MS-Koppelung 3200 E der Fa. Finnigan mit dem angeschlossenen Datensystem Finnigan 6000.

GC

Als GC diente der für Kapillarbetrieb ausgerüstete Gaschromatograph Finnigan mit programmierbarer Temperaturregelung und einem Grob-Split-Einlaßsystem. Als Trennsäule verwendeten wir eine 20 m lange Dünnschichtkapillare (0,3 mm ID) OV-1 der Fa. Jaeggi (Schweiz).

Als Trägergas diente Helium und als Detektor ein Totalionenstrom-Integrator. Die eingespritzte Extraktmenge richtete sich nach der Konzentration der einzelnen Verbindungen und wurde entweder durch einen Testlauf oder aus dem FID-Chromatogramm ermittelt. Durch nachfolgendes Abblasen des Lösungsmittels mit N₂ wurde der Extrakt auf eine geeignete Konzentration gebracht, so daß sich die entsprechende Einspritzmenge zwischen 2 und 5 µl bewegte.

Es wurde splitlos injiziert, nach 30 sec der Split auf ein Verhältnis von 1:20 (entspricht 1,5 ml He pro min) eingestellt, nach 2,5 min - nachdem das Lösungsmittel die Säule durchlaufen hatte - isotherm auf 50 °C und dann mit 6 °C pro min Heizrate bis auf 220 °C (Programm-hold) aufgeheizt. Abgeänderte Programme sind in den Legenden zu den jeweiligen TIC angegeben. Die Temperatur des Einspritzblocks und der beheizten Interface-Leitung zum Massenspektrometer betrug jeweils 220 °C.

MS

Als Interface-Leitung zur Verbindung mit dem Massenspektroskop diente eine Pt - Ir - Kapillare, die direkt in die Ionenquelle reicht. Der MS - Teil ist als Quadrupol-

Spektrometer mit einer Elektronenstoß - (EJ) - Ionenquelle ausgelegt (Elektronenenergie : 70 eV, Quellentemperatur 60 °C). Die resultierenden Massenspektren (Scanzeiten siehe bei den jeweiligen Chromatogrammen) wurden fortlaufend im Datensystem gespeichert, sowohl als TIC als auch als Massenspektren registriert und wahlweise ausgedruckt. Zur Auswertung und Identifizierung der Massenspektren zog ich die Lehrbücher von SEIBL (1974) und BUDZIKIEWICZ (1972) heran und verglich die Spektren mit entsprechenden Originalspektren nach STENHAGEN et al. (1974).

Die Aufnahme der Massenspektren führte freundlicherweise Herr Dr. O. Vostrowsky vom Institut für Organische Chemie II der Universität Erlangen-Nürnberg durch.

III ERGEBNISSE

1) Algenwachstum

a) Vermehrung der Algen:

Ausgehend von einer Suspensionsdichte von 10^7 Zellen pro ml erreichen die Algen ohne Anlaufphase in einer für jeden Stamm charakteristischen Zeit das Ende ihrer logarithmischen Vermehrungsrate. Um einheitliche reproduzierbare Algenpopulationen für die Extraktion zu erhalten, wurden die Wachstumsparameter solange bestimmt, bis die logarithmische in die stationäre Phase überging. Die Zunahme von Trockengewicht und optischer Dichte verlief annähernd parallel zur Zellzahl, so daß ich auf deren Darstellung verzichten konnte. Sie wurde nur dann berücksichtigt, wenn bei der Zellzahl der Übergang zur stationären Phase strittig war.

Errechnet man nach FOTT (1971) den Wert k' (Steigung der Geraden im logarithmischen Maßstab), so ergeben sich für jeden Stamm charakteristische Werte, wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist.

Der weitaus überwiegende Teil der Stämme erreichte das Ende der log - Phase nach spätestens sechs Tagen, nur wenige brauchten länger, wobei *C. luteoviridis* 211-5b und 211-3 je 13 Tage und *C. sorokiniana* Prag A-14 14 Tage benötigten. Dabei waren die Ausbeuten mit 0,14 , 0,22 bzw. 1,14 mg FG pro ml und Tag sehr schlecht, mittelmäßig bzw. sehr gut. Aus Tabelle 1 ist der tägliche Zuwachs des Frischgewichtes pro ml Algensuspension für den Bereich des exponentiellen Wachstums zu ersehen. Dieser Wert gibt die reelle Produktivität eines Stammes an. Hierbei streuen die Gewichtszunahmen innerhalb einer Art derart stark, daß eine Mittelwertbildung keinen Aussagewert hätte.

b) pH - Veränderungen:

Der pH - Wert des Nährmediums verschob sich während der Kulturdauer der Algen nur geringfügig von anfangs ca. 5,9 bis 7,1 (maximal 7,4) am Ende der log - Phase. Schwieriger waren die Verhältnisse bei *C. protothecoides*, da sie mit NH_4Cl als Stickstoffquelle wuchs. Zu Beginn stellte sich ein pH von allgemein 6,3 ein, der im Laufe der Zellvermehrung innerhalb einer Woche auf unter drei absinken konnte. Selbst wenn man die CO_2 - Zufuhr sperrte, verzögerte sich die Ansäuerung nur unwesentlich. Erntete man die Algen nicht spätestens bei $\text{pH} = 3$ ab, so verfärbten sie sich binnen eines Tages braun, schäumten und starben ab. Abb. 1 veranschaulicht in etwa diese Vorgänge.

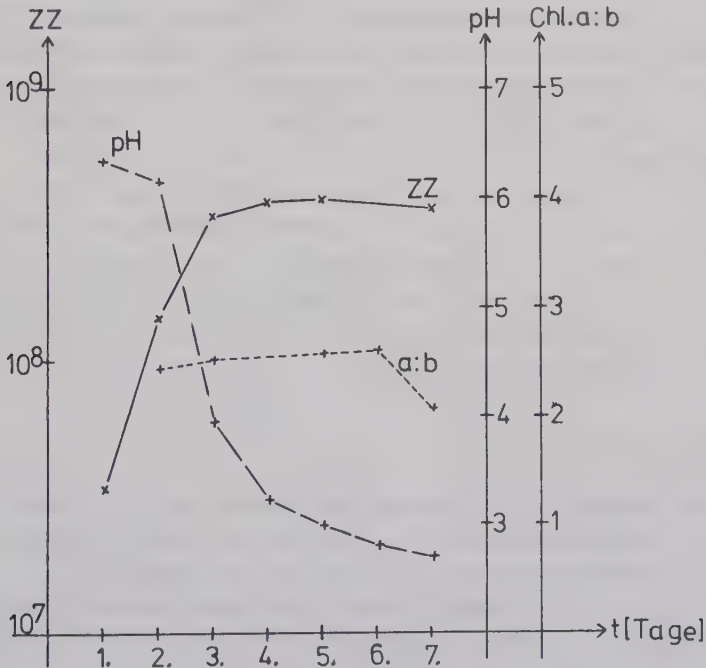


Abb. 1: Abhängigkeit der ZZ und des Chl. a:b - Verhältnisses vom pH-Wert während der Kulturdauer bei *C. protothecoides* 211-7b

Aus diesem Grunde gab es bei *C. protothecoides* einige Male sehr geringe Ausbeuten. Bei der Hälfte aller Fälle dauerte die log - Phase nur zwei bis drei Tage, in denen zwar eine ausgezeichnete Zunahme des FG zu verzeichnen war (siehe Tabelle 1), doch führte das im Endeffekt zu kümmerlichen Ausbeuten von weniger als 2 oder gar 1 g/l NM.

c) Trockengewicht:

Bei täglicher mikroskopischer Beobachtung der Algen fallen bald morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen auf. Neben Form, Grüntönung und Teilungsverhalten erkennt man deutlich die unterschiedlichen Größen. Dies haben FOTT und NOVAKOVA (1969) u.a. bei der Gattung *Chlorella* eingehend beschrieben. Bei meinen täglichen Routinemessungen wurde neben der Zellzahl auch das Trockengewicht bestimmt, so daß sich daraus leicht das Gewicht (TG) einer Alge errechnen läßt. Die in Tabelle 1 angegebenen Werte bestätigen weitgehend den optischen Eindruck. So verstopften die meisten Stämme von *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* und *C. protothecoides* wegen ihrer geringen Größe die Poren der Membranfilter und ließen sich entweder nur bei hohen Drehzahlen oder durch Zugabe von 0,01 M Phosphatpuffer (pH 6,5) (HELLMANN (1973)) in der Zentrifuge sedimentieren.

d) Chlorophyllgehalt:

Es ist bekannt, daß Pflanzen bei Veränderung der Umwelt (Licht- und Nährstoffmangel, Toxine) mit einer Änderung des Chlorophyllgehaltes und einer Verschiebung des Chlorophyll a:b - Verhältnisses reagieren (FEDTKE (1973), BOARDMAN et al, PORRA and GRIMME (1973)).

Diesen empfindlichen Indikator benutzte ich, um den physiologischen Zustand der *Chlorella* während des Wachstums zu überwachen.

C. protothecoides reagierte als einzige Art auf die pH-Verschiebung. Beließ man die Algen im NM mit einem pH unter 3, so verringerte sich das Chlorophyll und das Chl. a:b - Verhältnis (Abb. 1). Manchmal ließ sich bei *C. protothecoides* anhand der Chlorophyll - Bestimmung das Ende des Wachstums schneller erkennen als durch die Zellzahl oder das TG.

Durch hohe Rührergeschwindigkeiten (500 - 1000 U/min) im Fermenter konnte erreicht werden, daß alle Algen einer Population im Mittel die gleiche Lichtmenge genossen und das NM mit CO₂, in gelöster Form, gesättigt war. Damit konnten für die Photosynthese optimale Bedingungen geschaffen werden.

Verglich man Algensuspensionen gleicher Zellzahl, oder mikroskopisch die Zellen verschiedener Arten, so erschienen sie unterschiedlich stark grün gefärbt. Auch die Messungen bestätigten, daß der absolute Gehalt an Chlorophyll von Art zu Art schwankt (Tabelle 5).

T A B E L L E 1

Art	Stamm	k'	Zunahme FG in mg/ml/d	TG in pg	Chl. ges.-2 in mg/ml.10 ⁻²	Chl.a:b
<u>C.fusca</u> var.vacuolata Shihira et Krauss	211-8a	0,29	1,39	7,24	1,33	3,28
	211-8b	0,37	0,69	7,58	1,42	3,48
	211-8c	0,33	0,56	8,48	1,48	3,47
	211-8e	0,40	0,35	4,48	1,20	3,10
	211-8g	0,28	0,55	5,23	1,58	3,42
	211-8h	0,21	0,55	8,22	1,39	2,87
	211-11m	0,39	0,86	6,57	2,57	2,94
	211-11n	0,22	0,72	5,35	3,55	2,53
	211-15	0,41	0,30	0,97	4,30	3,66
	0-1.1.10	0,22	0,72	2,85	4,09	2,99
<u>C.fusca</u> var.fusca Shihira et Krauss	343	0,40	0,20	1,12	2,07	3,43
<u>C.fusca</u> var.rubescens (Dangeard)Kessler et al.	232/1	0,35	0,35	4,42	2,65	3,12
<u>C.homosphaera</u> Skuja	211-8eC	0,27	0,49	0,32	2,65	2,32

Art	Stamm	k'	Zunahme FG in mg/mL/d	TG in pg	Chl. ges. in mg/mL · 10 ⁻²	Chl.a:b
<u>C.luteoviridis</u> Chodat	211-2a	0,15	0,30	2,00	2,92	2,51
	211-2b	0,25	0,94	2,47	2,46	2,17
	211-3	0,21	0,22	2,00	2,56	2,84
	211-4	0,26	0,26	2,82	1,33	2,92
	211-5a	0,32	0,49	3,63	1,19	2,45
	211-5b	0,21	0,14	3,03	1,33	2,75
<u>C.saccharophila</u> (Krüger) Nadson	211-1b	0,32	2,22	1,27	1,91	4,01
	211-1c	0,53	0,56	0,94	1,42	2,93
	211-1d	0,29	4,37	1,46	3,29	3,68
	211-1f	0,23	0,40	1,67	1,20	3,32
	211-9a	0,39	0,53	1,52	1,40	3,37
	211-9b	0,33	0,17	1,24	0,35	2,50
	211-1a	0,32	0,41	2,98	1,11	1,87
	G-1.3.1	0,32	0,28	0,44	2,03	5,26
<u>C.minutissima</u> Fott et Novakova	G-1.1.9	0,33	0,38	2,34	1,35	3,20

Art	Stamm	k'	Zunahme FG in mg/ml/d	TG in pg	Chl. ges. in mg/ml · 10 ⁻²	Chl.a:b
<u>C. vulgaris</u> Beijerinck	211-1e	0,38	0,96	0,37	2,60	5,36
	211-8l	0,39	0,16	0,39	1,72	5,97
	211-8m	0,68	0,48	0,46	1,93	4,91
	211-11b	0,35	0,54	0,88	3,97	4,80
	211-11c	0,29	0,32	0,54	2,76	4,59
	211-11f ^x	0,48	1,26	0,52	4,52	4,35
	211-11j ^x	0,50	1,21	0,43	3,77	3,47
	211-11l ^x	0,62	1,21	0,63	2,07	3,44
	211-11p ^x	0,53	1,80	0,39	5,37	2,65
	211-11q ^x	0,62	0,93	0,86	2,09	3,48
	211-11s ^x	0,80	0,80	0,86	2,04	3,86
	211-11t ^x	0,73	2,05	0,42	3,35	3,33
	211-12 ^x	0,54	1,33	0,86	3,09	3,05
	211-19	0,27	0,25	0,41	3,46	4,64
	211-21 ^x	0,64	0,67	0,68	1,62	2,79
	395	0,36	0,32	0,32	2,96	4,55
	396	0,21	0,15	0,38	2,57	5,05
	211-11r ^x	0,85	0,23	1,11	2,99	2,75
	211-30	0,30	2,14	2,42	1,11	2,38
<u>C. zofingiensis</u> Dönz	211-14a	0,39	0,78	2,74	0,40	2,59
	211-14b	0,35	2,60	4,84	0,34	1,49
	211-14c	0,18	0,31	2,59	2,97	3,41
	G-1.2.1	0,21	0,30	4,70	2,15	3,07

Art	Stamm	k'	Zunahme FG in mg/ml/d	TG in pg	Chl. ges. in mg/ml.10 ⁻²	Chl.a:b
<u>C.kessleri</u> Fott et Novakova	211-11g	0,25	0,43	1,87	4,87	3,08
	211-11h	0,27	0,60	1,41	5,98	3,68
	397	0,44	0,62	1,86	3,53	3,42
	398	0,14	0,96	1,11	6,59	3,30
	C-1.1.1	0,31	0,40	1,60	5,10	3,51
	C-1.1.12	0,32	0,41	2,05	4,10	4,22
	C-1.2.2	0,31	0,55	1,53	4,62	3,44
<u>C.sorokiniana</u> Shihira et Krauss (=C.vulgaris f.tertia Fott et Novakova)	211-8k	0,22	3,74	0,59	7,87	3,43
	211-11d	0,24	0,24	0,88	1,92	5,59
	211-11k	0,35	0,88	1,07	7,12	3,58
	211-18	0,35	0,41	1,76	2,14	3,96
	211-32	0,45	0,29	0,26	2,14	4,27
	211-33	0,25	0,31	0,34	3,38	3,99
	211-34	0,48	0,44	0,45	4,21	3,54
	C-1.1.8	0,29	0,23	0,62	1,60	4,15
	C-1.6.7	0,19	0,43	0,32	3,25	3,42
	Sless 1	0,21	0,28	0,71	3,68	4,23
	Sless 2	0,23	0,44	0,37	6,58	3,85
	211-31	0,24	0,53	0,59	7,85	3,76
	1-9-30	0,24	0,65	0,30	4,71	3,81
	Prag A-14	0,20	1,14	0,71	4,67	2,34
	211-40a	0,22	0,78	0,29	10,26	4,58
	211-40c	0,21	0,67	0,26	8,27	4,40

Art	Stamm	k'	Zunahme FG in mg/ml/d	TG in pg	Chl. ges. in mg/ml $\cdot 10^{-2}$	Chl.a:b
<u>C. protothecoides</u> Krüger	211-7a	0,66	0,68	3,49	1,91	2,84
	211-7b	0,31	1,24	1,81	1,68	2,91
	211-7c	0,26	0,34	1,46	3,27	4,12
	211-7d	0,18	0,36	1,10	2,43	3,91
	211-8d	0,42	3,82	1,62	1,63	2,63
	211-10a	0,36	2,22	1,18	0,45	3,18
	211-10b	0,27	0,27	0,90	0,71	3,29
	211-10c	0,33	0,19	1,12	1,07	2,41
	211-10d	0,24	1,44	0,93	1,77	2,69
	211-10e	0,27	0,26	1,04	0,85	3,31
	211-11a	0,54	0,24	3,84	1,23	3,05
	211-11i	0,49	2,13	3,55	0,56	2,46
	211-13	0,33	0,60	0,78	2,93	3,00
	211-17	0,76	0,38	0,94	0,34	2,39

2) Algenextrakt

Für eine Gewinnung der lipophilen und zum Teil leichtflüchtigen Bestandteile von Algen bieten sich mehrere Methoden an, die ich auf ihre Ökonomie hin überprüfte. Das Ausschütteln der Algen im Scheidetrichter mit nachdestilliertem Petroläther erwies sich als sehr arbeitsintensiv und verursachte, aufgrund des Nernst'schen Verteilungsgesetzes, einen hohen Lösungsmittelverbrauch. Der gewonnene Extrakt war dann so verdünnt, daß er vor der Analyse im Rotationsverdampfer eingeengt werden mußte. Der daraus resultierende Verlust der leichtflüchtigen Algenbestandteile ließ diese Aufarbeitungsmethode als ungeeignet ausscheiden, zumal das rückgewonnene Lösungsmittel für einen weiteren Einsatz unbrauchbar geworden war.

Die Extraktion im Soxhlet - Apparat begnügte sich mit nur 500 ml Petroläther, enthielt aber nach einem Durchlauf von 24 Stunden größere Mengen hochsiedender Fettanteile, die den anschließenden Chromatographievorgang beeinträchtigten. Wie auch beim Ausschütteln waren die interessantesten leichtflüchtigen Substanzen noch zu verdünnt und verloren sich beim Einengen, so daß die hochmolekularen Anteile noch konzentrierter vorlagen.

Als dritte Möglichkeit ergab sich die Wasserdampfdestillation, bei der die bis 100 °C flüchtigen Substanzen mit dem Wasserdampf aus dem Kolben in die Vorlage gelangen und in n-Hexan aufgefangen werden. Diese Methode, modifiziert nach DAB 7 und beschrieben bei STAHL, hat den Vorteil, daß hauptsächlich die Substanzen übergetrieben werden, die sich im normalen Arbeitsbereich eines Gaschromatographen bewegen. Darüber hinaus liegen sie bereits in nahezu idealer Konzentration vor und bedürfen fürs erste keiner Vortrennungen. Letzteres war insofern wichtig, als Vorversuche gezeigt haben, daß eine säulen- oder dünnschicht- chromatographische Vortrennung des erhaltenen Extraktes (nach HARBORNE (1973), DUDLEY und ANDERSON (1975)) mit derart hohen Verlusten verbunden

war, daß nur für einige wenige Verbindungsklassen, wie Alkane bei genügend hoher Konzentration, erkennbare Gaschromatogramme zu erhalten waren. Wie sich im Laufe der Zeit zeigte, gab es eine Menge Algen, deren Anteil extrahierbarer Substanzen - auch Alkane - so gering war, daß eine Vortrennung keine Resultate mehr erbracht hätte. Für die massenspektroskopischen Untersuchungen lag ohnehin die Konzentration der meisten Substanzen unterhalb der Nachweisgrenze. Waren Extrakte noch zu stark verdünnt, so ließen sie sich vorsichtig mit Stickstoff ohne nennenswerten Substanzverlust konzentrieren.

In Tabelle 2 sind die prozentualen Anteile des eingedampften Gesamtextraktes bezogen auf das Trockengewicht der eingesetzten Algenmenge angegeben. Dazu ist anzumerken, daß dann nur noch die Bestandteile ausgewogen werden konnten, deren t_r entweder größer als 13 min oder die schwerflüchtig waren, da die leichtflüchtigen Substanzen mit dem Lösungsmittel ausgetrieben wurden (vergl. Abb. 3 und 4). Der Extrakt selbst ist farblos bzw. nur bei hohem Fettgehalt leicht grau. Der Geruch ist zwar charakteristisch, läßt sich aber nur schwer definieren. VELEV (1973) hat den Extrakt von *Scenedesmus* aufgetrennt und festgestellt, daß eine ganze Reihe von Geruchskomponenten vorliegen, die er aber auch nur mit Begriffen wie "angenehm" und "unangenehm" umschreiben konnte.

3) Gaschromatographie

Da die Konzentration der extrahierten Substanzen im Lösungsmittel recht unterschiedlich war und außerdem die Algen selbst unterschiedliche Mengen an wasserdampf-flüchtigen Verbindungen besitzen, ist ein quantitativer Vergleich zwischen den Peakflächen verschiedener Algengestämme bei der gleichen Substanz nicht möglich. Aus diesem Grund wird im Folgenden immer der prozentuale Anteil

der jeweiligen Substanz vom Gesamtextrakt angegeben und zwar von den Substanzen, deren Peakfläche größer als 0,1 % aller Gipfelflächen ist.

Betrachtet man die Chromatogramme aller 88 Algenstämme, so bemerkt man eine bestimmte Regelmäßigkeit im Erscheinungsbild, unabhängig von der Zahl der Komponenten und deren Intensität (Abb. 3). In der Peakflanke des Lösungsmittels bis zu einer Retentionszeit von ca. 10 min erscheinen wenige Spitzen (0-5). Daran schließen sich mehrere kleine Gipfel an, die kaum einmal über 10-15 % der Höhe hinauskommen. Ab ca. 15 min beginnt ein Bereich, in dem die Mehrzahl aller Peaks, mit z.T. überragender Größe liegen. Nach ca. 30 min endet dieser Bereich mit dem meist überraschten Signal der Palmitinsäure. An den Flanken dieses Peaks finden sich mehrere kleine bis mittlere Spitzen. Bis zum Ende des Chromatogramms treten dann regelmäßig periodisch abwechselnd kleine und große Peaks auf.

Die Gesamtzahl der Gipfel pro Chromatogramm ist uneinheitlich. Sie wird in Tabelle 2 in der Spalte "Peaks" angegeben. Innerhalb einer Art schwankt die Anzahl der extrahierten Verbindungen ebenfalls. Dennoch kann man Arten erkennen, die wenige, mittelmäßig viele und viele verschiedene Substanzen besitzen (Tabelle 6).

Sieht man einmal von der Palmitinsäure ab, so erkennt man - besonders bei substanzarmen Extrakten - homologe Reihen. STRANSKY et al. (1968), GELPI et al. (1970), VELEV (1973) und andere fanden übereinstimmend, daß bei einzelligen Grünalgen regelmäßig n-Alkane auftreten. Darunter dominiert das n-Heptadecan ($n-C_{17}H_{36}$). Davon ausgehend nehmen die n-Alkane in Zweierschritten ab. Dazwischen liegen die Gipfel mit den wesentlich niedrigeren geradkettigen n-Alkanen (Abb. 2). Diese Tatsache konnte durch meine Arbeit bestätigt werden, obgleich sich nicht alle Algen an diese Regel hielten.

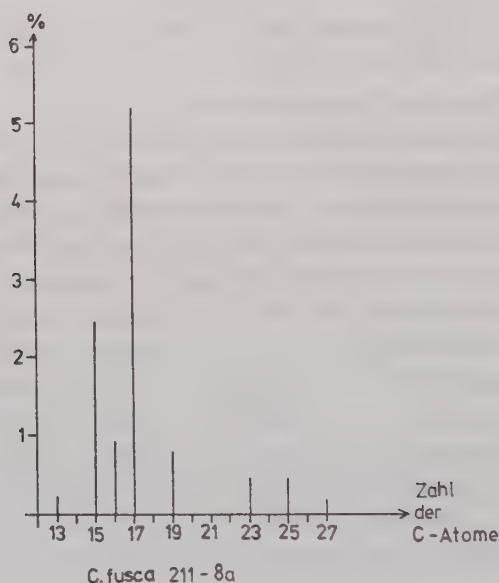


Abb. 2: Prozentuale Verteilung der n-Alkane im Algenextrakt

Bei 13 Algen war das Maximum entweder zum n-Pentadecan ($n\text{-C}_{15}\text{H}_{32}$) oder zum n-Nonadecan ($n\text{-C}_{19}\text{H}_{40}$) hin verschoben. Sehr oft aber waren n-Heneicosan ($n\text{-C}_{21}\text{H}_{44}$) und n-Tricosan ($n\text{-C}_{23}\text{H}_{48}$) weder einzeln noch zusammen aufzufinden, da sie von der dazwischen liegenden Palmitinsäure ($\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$) nicht mehr abgetrennt wurden (vergl. Tabelle 2). Das gleiche geschah mit den schwach ausgeprägten Paraffinen mit gerader C-Atomzahl. Bei substanzarmen Algen ließen sie sich, obwohl sie viel kleiner sind als die benachbarten ungeradzahligen Alkane, dennoch zwischen den übrigen Substanzen herausfinden.

Häufiger wurden sie aber von Verbindungen mit nahezu gleicher tr oder höherer Konzentration überlagert. In Abb. 2 (C. fusca 211-8a) läßt sich das n-Hexadecan ($n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$) (Peak 21) als einziges geradkettiges n-Alkan erkennen. Alle übrigen geradzahligen Homologen sind nicht mehr sicher von den übrigen Peaks abzutrennen.

Engt man den Extrakt mit Stickstoff bis zur Trockne ein, nimmt den Rückstand wieder mit n-Hexan auf und fertigt davon ein GC an, so kann man deutlich erkennen, welche Substanzen leichtflüchtig sind. Abb. 4 stellt ein solches Differenzspektrogramm dar. Obgleich der zweite Extrakt verdünnter war als der von Abb. 3, erkennt man deutlich, daß bis zu einer Retentionszeit von ca. 13 min alle Substanzen nahezu vollständig verschwunden sind, und im weiteren Verlauf einige leichtflüchtige Substanzen reduzierte Signale ergeben. Unter Abb. 3 sind die identifizierten Verbindungen aufgeführt.

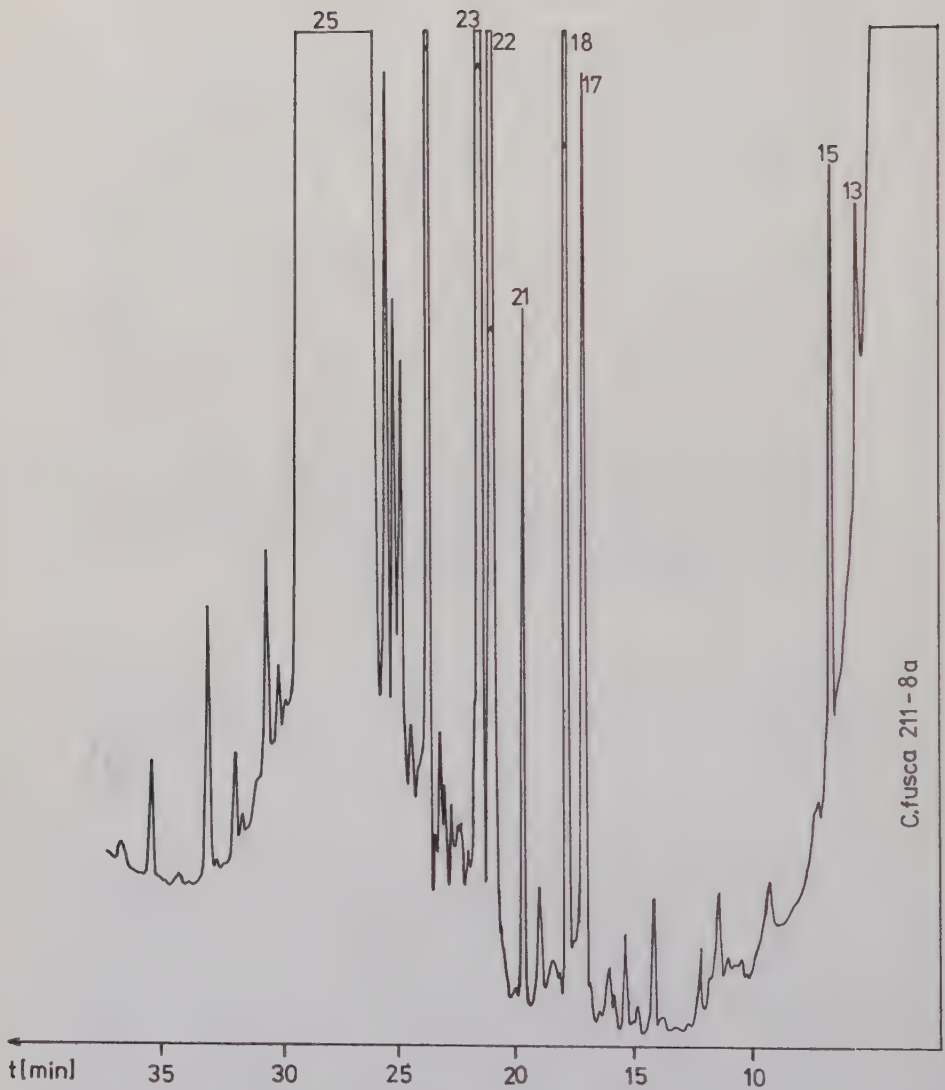


Abb. 3: GC von *C. fusca* 211-8a

13	Terpenalkohol	18	n-Pentadecan	23	n-Heptadecan
15	Terpenoid	21	n-Hexadecan	25	Palmitinsäure
17	β -Jonon	22	n-Heptadecen		

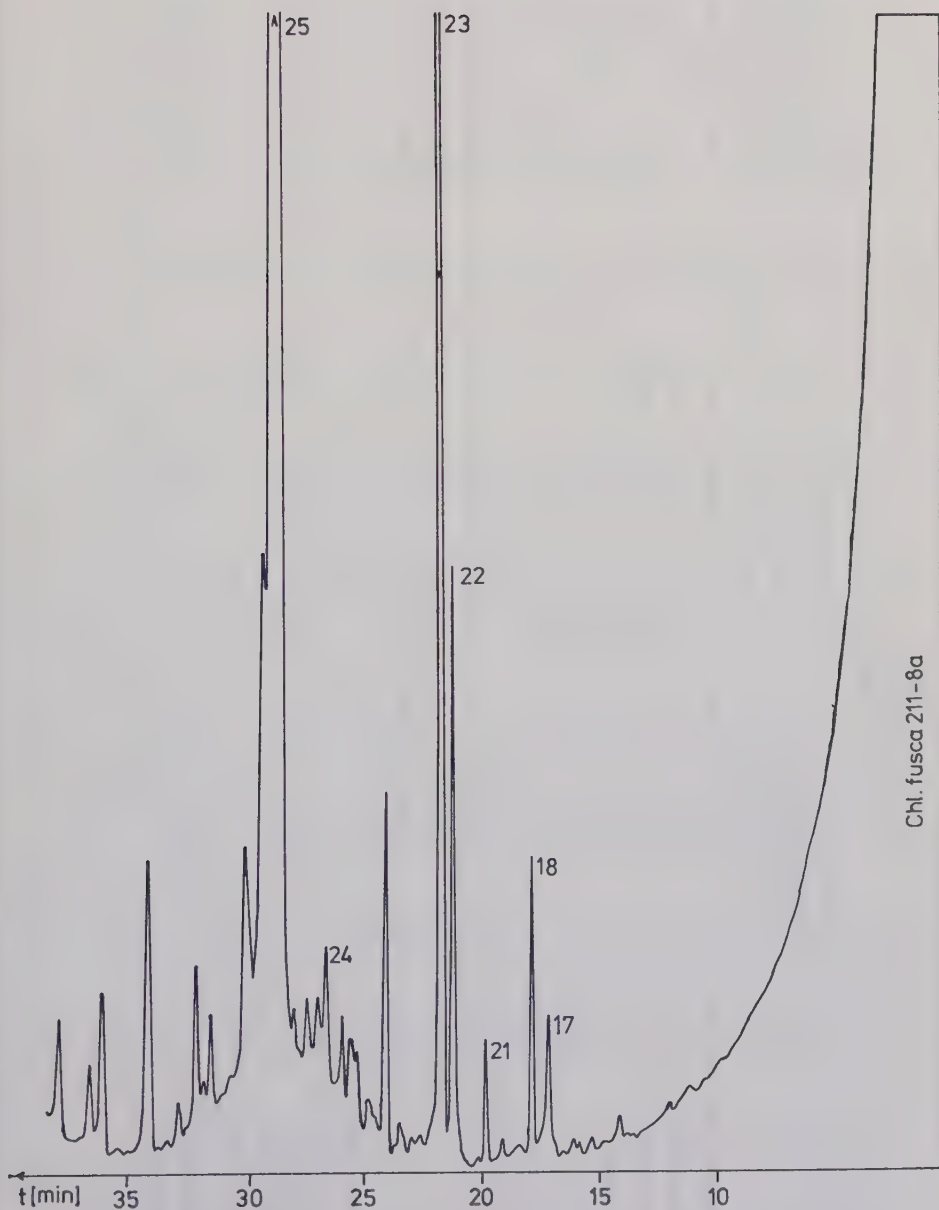


Abb. 4: GC von *C. fusca* 211-8a nach dem Abblasen des Lösungsmittels und der Wiederaufnahme des Extraktes mit n-Hexan

T A B E L L E 2

Art	Stamm	Peaks	Gesamt-Extrakt	C ₁₅ H ₃₂	C ₁₇ H ₃₆	C ₁₉ H ₄₀	C ₂₁ H ₄₄	C ₂₃ H ₄₈	n-Alkane in %	Palmitinsäure
<u>C. fusca</u> var. <u>211-8a</u> <u>vacuolata</u> Shihira et 211-8c Krauss		37	0,481	2,46	5,20	0,79	--	0,44	8,89	75,12
		33	0,156	2,05	6,78	0,36	--	0,39	9,58	10,65
		32	1,058	9,76	12,00	1,50	0,84	--	24,10	28,73
		28	0,108	0,62	16,01	0,88	--	--	17,51	29,84
		26	0,158	0,49	33,81	5,59	--	--	39,89	35,21
		22	0,119	2,64	40,21	--	--	0,31	43,16	5,91
		22	0,068	1,23	6,91	0,19	0,37	0,31	9,01	44,00
		22	0,355	1,02	3,05	0,56	--	0,53	5,16	10,00
<u>C. fusca</u> var. <u>343</u> <u>Shihira et Krauss</u>		23	0,282	1,70	6,73	1,70	--	1,95	12,08	31,93
		26	0,092	0,90	2,77	--	--	0,32	3,99	--
		31	0,132	0,10	7,02	3,71	--	0,31	11,14	16,64
<u>C. fusca</u> var. <u>232/1</u> <u>rubescens (Dangeard)</u> Kessler et al.		37	0,203	9,60	33,10	4,20	--	--	46,90	19,26
<u>C. homospaera</u> Skuja	211-8eC	24	0,879	0,58	6,28	7,17	--	1,41	15,44	40,85

Art	Stamm	Peaks	Gesamt-Extrakt	C ₁₅ H ₃₂	C ₁₇ H ₃₆	C ₁₉ H ₄₀	C ₂₁ H ₄₄	C ₂₃ H ₄₈	n-Alkane in %	Palmitin-säure
<u>C.luteoviridis</u> Chodat	211-2a	32	0,133	5,02	22,79	3,18	0,67	1,35	23,01	38,25
	211-2b	19	1,177	1,84	10,37	0,95	1,93	--	15,09	6,85
	211-3	30	0,107	0,13	34,98	1,53	--	--	36,64	28,87
	211-4	24	3,025	1,99	2,98	1,28	3,32	--	9,57	11,90
	211-5a	22	1,824	0,47	40,33	0,70	0,35	--	41,85	41,45
	211-5b	36	1,390	3,89	10,89	0,72	--	--	15,50	34,33
<u>C.saccharophila</u> (Krüger) Nadson	211-1b	17	1,854	0,12	46,42	0,16	--	--	46,70	41,94
	211-1c	18	1,043	--	42,47	2,74	--	1,41	46,62	16,62
	211-1d	13	1,296	--	31,41	1,03	--	1,65	34,09	28,07
	211-1f	31	1,103	2,13	22,13	0,75	--	--	24,83	36,11
	211-9a	23	1,567	0,47	41,26	1,17	2,02	--	44,92	7,53
	211-9b	28	1,135	4,11	6,77	2,57	1,16	--	14,61	27,42
	211-2a	16	4,552	0,05	12,20	0,46	--	--	12,71	76,86
	C-1.3.1	27	0,772	0,81	21,45	4,63	--	0,63	27,52	26,78
<u>C.minutissima</u> Fott et Novakova	C-1.1.9	25	0,695	1,75	9,17	1,38	--	--	12,30	53,83

Art	Stamm	Peaks	Gesamt-Extrakt	C ₁₅ H ₃₂	C ₁₇ H ₃₆	C ₁₉ H ₄₀	C ₂₁ H ₄₄	C ₂₃ H ₄₈	n-Alkane in %	Palmitin-säure
<u>C. vulgaris</u> Beijerinck	211-1e	35	0,329	0,54	18,33	4,36	2,95	1,63	27,81	1,20
	211-8l	25	1,392	2,46	6,99	1,94	--	--	11,39	56,33
	211-8m	42	0,600	2,19	11,97	0,76	--	0,12	15,04	12,95
	211-11b	23	0,358	1,88	1,76	1,55	--	--	5,19	9,17
	211-11c	18	0,584	15,52	11,63	3,71	1,35	--	33,21	7,30
	211-11f ^x	21	1,064	6,39	7,57	4,30	0,26	0,06	18,58	9,79
	211-11j ^x	33	1,265	0,43	9,85	3,43	0,25	--	13,96	11,70
	211-11l ^x	21	1,093	12,30	19,25	3,50	3,87	--	38,92	6,94
	211-11p ^x	17	1,345	3,81	21,20	4,42	--	--	29,43	18,55
	211-11q ^x	24	1,079	0,35	15,40	0,57	0,38	--	16,70	20,11
	211-11s ^x	31	2,306	2,64	9,21	2,71	--	0,91	15,47	24,05
	211-11t ^x	29	1,882	0,58	20,33	0,92	1,85	--	23,68	7,99
	211-12 ^x	25	1,369	0,32	12,06	1,27	0,74	0,70	15,09	36,90
	211-19	30	1,265	0,53	9,80	0,87	0,96	--	12,16	14,51
	211-21 ^x	29	2,204	--	11,09	3,93	1,27	0,49	16,78	30,82
<u>C. zofingiensis</u> Dönz	395	27	0,616	0,25	18,82	1,15	0,57	0,66	21,45	41,93
	396	36	0,797	1,67	8,78	2,72	0,63	--	13,80	14,16
	211-11r ^x	43	0,908	2,00	17,57	3,02	0,96	0,32	23,87	18,43
	211-30	32	0,389	0,33	56,91	3,13	3,92	0,55	64,84	9,75
	211-14a	24	0,500	0,47	15,88	1,80	--	--	18,55	14,80
	211-14b	26	0,579	1,35	42,62	0,46	--	0,31	44,74	20,54
	211-14c	27	0,585	0,17	9,46	0,73	0,47	--	10,83	49,35
	G-1.2.1	25	0,665	0,94	35,55	3,45	0,47	--	40,50	18,30

Art	Stamm	Peaks	Gesamt-Extrakt	C ₁₅ H ₃₂	C ₁₇ H ₃₆	C ₁₉ H ₄₀	C ₂₁ H ₄₄	C ₂₃ H ₄₈	n-Alkane in %	Palmitin-säure
<u>C. kessleri</u> Fott et Novakova	211-11g	38	0,137	1,37	8,84	1,29	3,30	--	14,80	21,69
	211-11h	32	0,034	0,83	19,77	1,80	--	0,73	23,13	23,43
	397	40	0,062	2,51	1,86	1,41	0,48	0,49	6,75	33,32
	398	40	0,043	0,66	2,50	1,43	0,31	0,36	5,26	55,31
	G-1.1.1	31	0,102	0,39	4,02	0,93	--	--	5,34	26,38
	G-1.1.12	36	0,134	0,16	4,51	7,00	--	0,57	12,24	57,59
	G-1.2.2	25	0,077	1,68	2,40	1,68	0,46	--	6,22	29,53
<u>C. sorokiniana</u> Shihira et Krauss (=C. vulgaris forma tertia Fott et Novakova)	211-8k	24	0,408	0,47	4,36	2,99	0,52	--	8,34	47,37
	211-11d	41	1,685	0,67	6,95	2,82	2,20	--	12,64	36,92
	211-11k	22	0,407	--	3,04	2,29	0,73	--	5,88	50,68
	211-18	20	0,846	0,17	2,49	1,38	0,64	--	4,68	49,19
	211-32	38	1,319	0,37	1,89	0,71	0,71	2,31	6,00	62,36
	211-33	30	1,200	1,03	1,88	2,14	--	1,05	6,10	37,25
	211-34	30	0,830	0,37	1,46	0,54	0,58	--	2,95	58,51
	G-1.1.8	26	0,883	0,45	2,46	1,23	0,61	--	5,75	45,46
	G-1.6.7	29	1,407	1,29	8,62	6,65	1,53	--	18,09	29,06
	Sless 1	23	1,740	2,87	2,29	1,45	--	--	6,61	11,48
	Sless 2	18	0,752	0,23	2,73	1,64	0,40	--	5,00	63,78
	211-31	29	1,014	1,64	2,19	1,24	0,29	--	5,36	68,35
	1-9-30	30	0,669	0,59	2,11	2,71	0,81	--	6,22	33,15
	Prag A-14	24	0,839	0,75	11,90	3,15	--	0,80	16,60	29,18
	211-40a	25	0,948	1,61	2,50	3,96	1,03	--	9,10	29,70
	211-40c	25	1,236	0,66	4,94	3,18	1,49	--	10,27	25,84

Art	Stamm	Peaks	Gesamt-Extrakt	C ₁₅ H ₃₂	C ₁₇ H ₃₆	C ₁₉ H ₄₀	C ₂₁ H ₄₄	C ₂₃ H ₄₈	n-Alkane in %	Palmitin-säure
<u>C.</u> <u>protothecoides</u> Krüger	211-7a	32	0,352	0,23	1,01	4,00	--	--	5,24	75,74
	211-7b	25	0,992	1,03	3,82	1,66	--	--	6,51	44,80
	211-7c	26	1,108	2,14	2,26	5,35	1,52	0,42	11,69	52,77
	211-7d	21	1,024	0,64	0,70	--	--	--	1,34	83,48
	211-8d	24	1,562	1,66	20,12	10,36	0,42	--	32,56	19,52
	211-10a	27	2,470	0,22	0,44	--	--	1,65	2,29	47,37
	211-10b	28	1,027	0,09	1,80	1,22	--	0,24	3,35	74,16
	211-10c	32	2,680	0,76	6,38	1,30	0,91	--	9,35	12,97
	211-10d	28	1,776	1,50	8,74	11,50	2,46	--	24,20	24,30
	211-10e	26	1,751	2,24	1,55	4,77	--	--	8,56	44,56
	211-11a	21	0,909	0,96	1,68	1,06	0,51	--	4,21	37,31
	211-11i	29	2,305	1,55	6,50	--	--	--	8,05	16,43
	211-13	25	0,690	--	2,76	2,72	--	--	8,48	52,70
	211-17	25	1,564	1,25	9,44	3,20	0,31	0,23	14,43	42,30

4) Massenspektroskopie

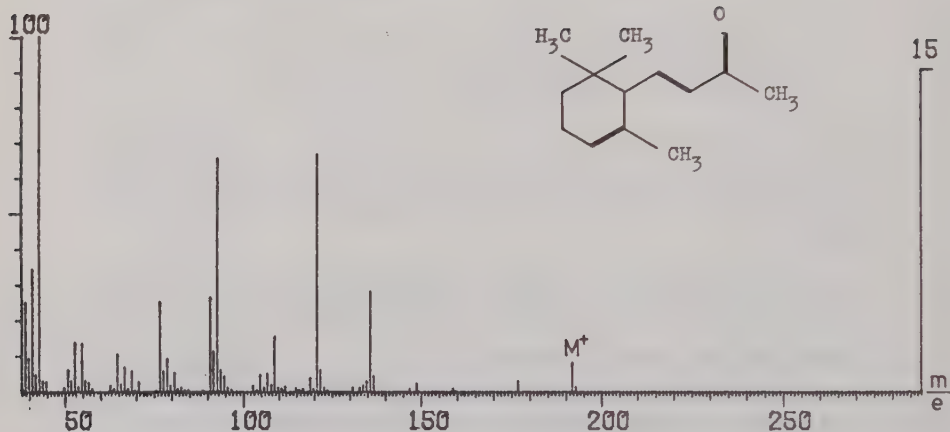
Zusätzlich zur gaschromatographischen Analyse der zuvor beschriebenen 88 Chlorella - Stämme wurden 10 verschiedene Stämme ausgewählt und massenspektroskopisch untersucht. Von allen Substanzen mit genügend hoher Konzentration konnte man vollständige Massenspektren erhalten. Manche Stämme wurden durch das Übergewicht benachbarter Verbindungen oder durch zu geringe Substanzmenge beeinträchtigt, so daß eine Identifizierung nicht möglich war.

In den zu den Abb. 9 bis 18 gehörenden Tabellen wurden diese Substanzen mit einem Fragezeichen versehen. Manche Spektren sind aus vorgenannten Gründen zwar unvollständig, doch läßt sich anhand verschiedener Bruchstücke eine ungefähre Angabe über ihre Zusammensetzung machen, so daß man im günstigen Falle die Summenformel angeben oder sie als KW oder sauerstoffhaltige Substanz ansprechen kann.

Jedem Totalionenstrom - Chromatogramm folgt eine Tabelle mit den Charakteristika der einzelnen Substanz, wobei unter der Rubrik "Strukturvorschlag" nur solche Substanzen aufgeführt wurden, die nicht öfter wiederkehren oder sich einfacher mittels Strukturformel wiedergeben lassen. Für die große Gruppe der Terpene ließen sich keine sicheren Einzelverbindungen ermitteln, so daß Strukturvorschläge unterblieben.

Zwei interessante (Abb. 5: α -Jonon und β -Jonon) und zwei häufig vorkommende Verbindungen (Abb. 6: n-Heptadecan und Palmitinsäure) sollen stellvertretend für die übrigen Massenspektren abgebildet werden.

C. FUSCA 211-8a W-DAMPF 2JUL
470 RET.= 14.91 MIN



C. FUSCA 211-8a W-DAMPF 2JUL
518 RET.= 16.11 MIN

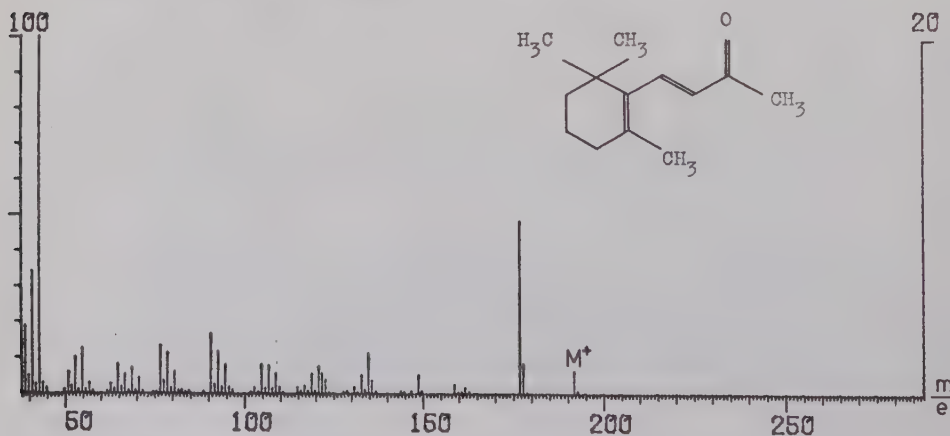
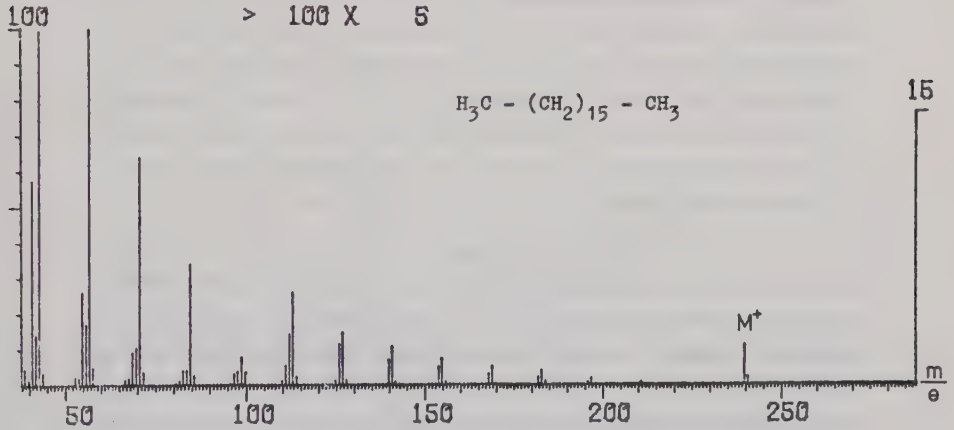
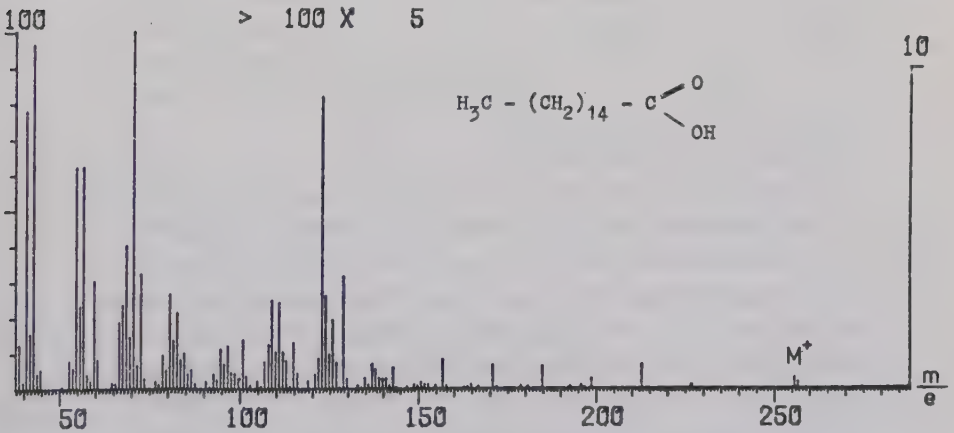


Abb. 5: Massenspektren von α - und β -Jonon

C. FUSCA 211-8a W-DAMPF 2JL
173 RET.= 21.27 MIN, -BG 161



Massenspektrum von n-Heptadecan



Massenspektrum von Palmitinsäure

Abb. 6: Massenspektren von n-Heptadecan und Palmitinsäure

Bei *C. protothecoides* 211-7a und bei *C. minutissima* C-1.1.9 erscheinen einige Spektren, die silylierte Verbindungen anzeigen. Zu Beginn der Wasserdampf-Destillation tritt eine Schaumbildung auf, die bei verschiedenen Algen so stark wird, daß eine kontinuierliche Destillation nicht mehr möglich ist. Siliconfett unterdrückte den Schaum, reagierte aber mit einigen höhermolekularen Bestandteilen, so daß diese in leichtflüchtige Form übergeführt mit dem Wasserdampf in die Vorlage gelangten. Diese Trimethyl-silyl-Verbindungen konnten nicht identifiziert werden und erscheinen in der Spalte "Strukturvorschlag" als TMS.

Die Trennsäule war mit der Phase OV-1 als Dünnschicht belegt, was in der Polarität den Trenneigenschaften der von mir verwendeten gepackten Säule (SE 30) entspricht. Wie Abb. 7 und 8 zeigen, sind beide Chromatogramme mit einigem Vorbehalt vergleichbar und es lassen sich somit die entsprechenden Peaks aus dem FID-GC mit denen des GC-MS vergleichen.

Sehr unterschiedlich war das Substanzmuster zwischen den einzelnen Stämmen und Arten. Dominierend sind die gesättigten und ungesättigten reinen Kohlenwasserstoffe. Daneben gibt es noch oxidierte Formen wie Alkohole, Ketone, Aldehyde und organische Säuren, Aromaten und Terpen- und terpenoide KW.

Mit zunehmender Retentionszeit treten zuerst verzweigte und unverzweigte, gesättigte und ungesättigte kettenförmige KW auf bis zu einem MG von 114. Nach ca. $t_r = 4$ min folgen Monoterpene und Terpenoide mit einem MG von 136 und 138, allerdings in unterschiedlicher Anzahl und auch nicht bei allen untersuchten Algen. Daran anschließend, nach ca. $t_r = 6$ min, tritt eine umfangreiche heterogene Gruppe aus Alkoholen, Aromaten und anderen sauerstoffhaltigen Verbindungen auf, wobei auffallend ist, daß in diesem Bereich reine

Alkane und Alkene mit 11 bis 14 C-Atomen nur ganz vereinzelt und in geringer Intensität erscheinen (*C. fusca* 211-8g, *C. protothecoides* 211-7a, *C. minutissima* C-1.1.9, *C. vulgaris* 211-1e, *C. sorokiniana* 211-8k).

Dieser heterogene Block wird nach ca. 17 min von einem Bereich abgelöst, der überwiegend aus einfachen KW besteht, mit Pentadecan beginnt und sich je nach Temperaturprogramm bis maximal zum $C_{23}H_{48}$ (Tricosan) erstreckt (*C. fusca* 211-8g, *C. luteoviridis* 211-2a). Darin eingestreut finden sich nur noch wenige Verbindungen, meist die oxidierten Derivate der analogen Alkane und Alkene. In den meisten Fällen dominiert in diesem Bereich das Signal der Palmitinsäure $C_{15}H_{31}COOH$ mit einer tr von ca. 29 min.

Die gesättigten organischen Säuren entstehen beim normalen enzymatischen Fettsäureaufbau als Ketten mit gerader C-Atomzahl. Nach HARBORNE und anderen Autoren entstehen aus den Fettsäuren durch Kettenverlängerung und Decarboxylierung die Alkane. Im einfachsten Schritt wird aus der C-16-Fettsäure das C-17-Alkan, und tatsächlich stellt das n-Heptadecan in allen Algen prozentual den Hauptanteil an allen unverzweigten, gesättigten KW. Weitere Subtraktion und Addition von C_2 -Gruppen führt zur Kettenverkürzung bzw. -verlängerung. Damit läßt sich erklären, weshalb die Peaks ungeradzähliger n-Alkane über die geradzähliger dominieren und von $C_{17}H_{34}$ ausgehend mit abnehmender bzw. mit steigender C-Atomzahl immer kleiner werden. VELEV (1973) gibt z.B. für *Scenedesmus acutus* (Meyen) Chod. 8, Tomasselli ein prozentuales Verhältnis von ungeraden zu geraden n-Alkanen von 1,57 und STRANSKY et al.(1968) für *Scenedesmus quadricauda* ein solches von 4,78 an.

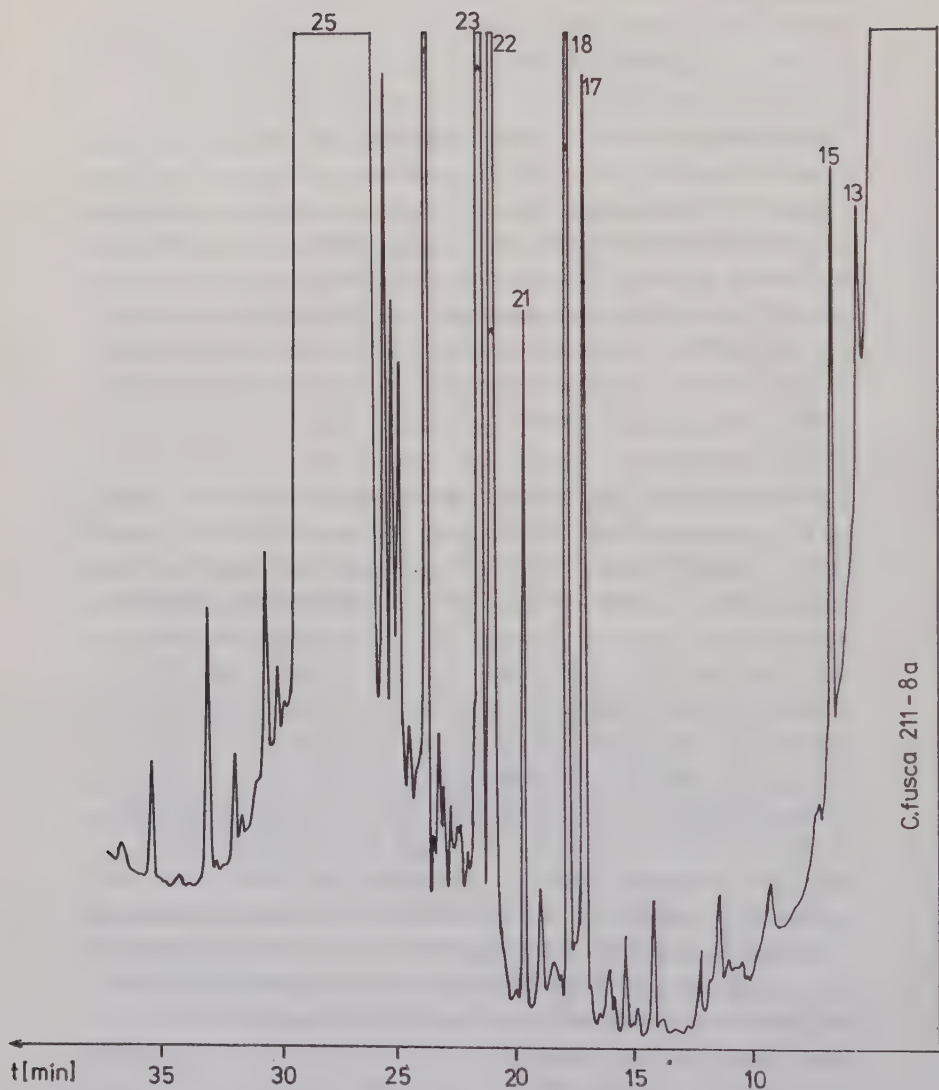


Abb. 7: GC von *C. fusca* 211-8a

13 Terpenalkohol	18 n-Pentadecan	23 n-Heptadecan
15 Terpenoid	21 n-Hexadecan	25 Palmitinsäure
17 β -Jonon	22 n-Heptadecen	

C. FUSCA 211-8A/3W-DAMPF 2µL
2. HAEUFTE VON GC

C. FUSCA 211-8A/3W-DAMPF 2µL

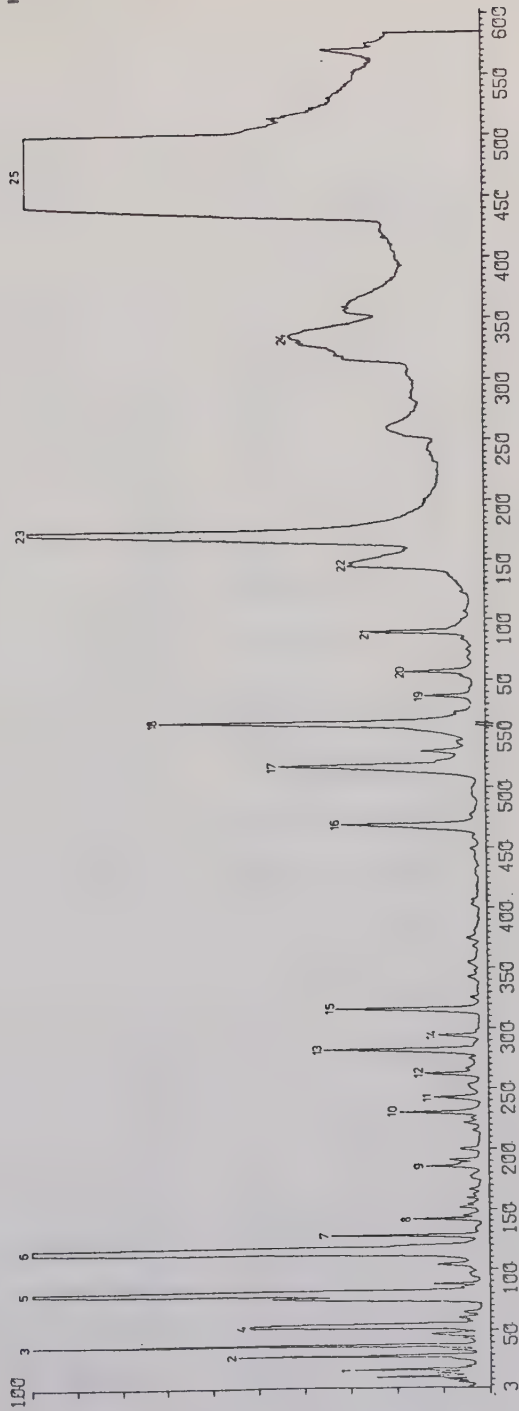


Abb. 8: TIC von C. fusca 211-8a

C. FUSCA 211-8A/3.W-DAMPF 2µL
2. HAELEFTE VON GC

C. FUSCA 211-8A/3.W-DAMPF 2µL

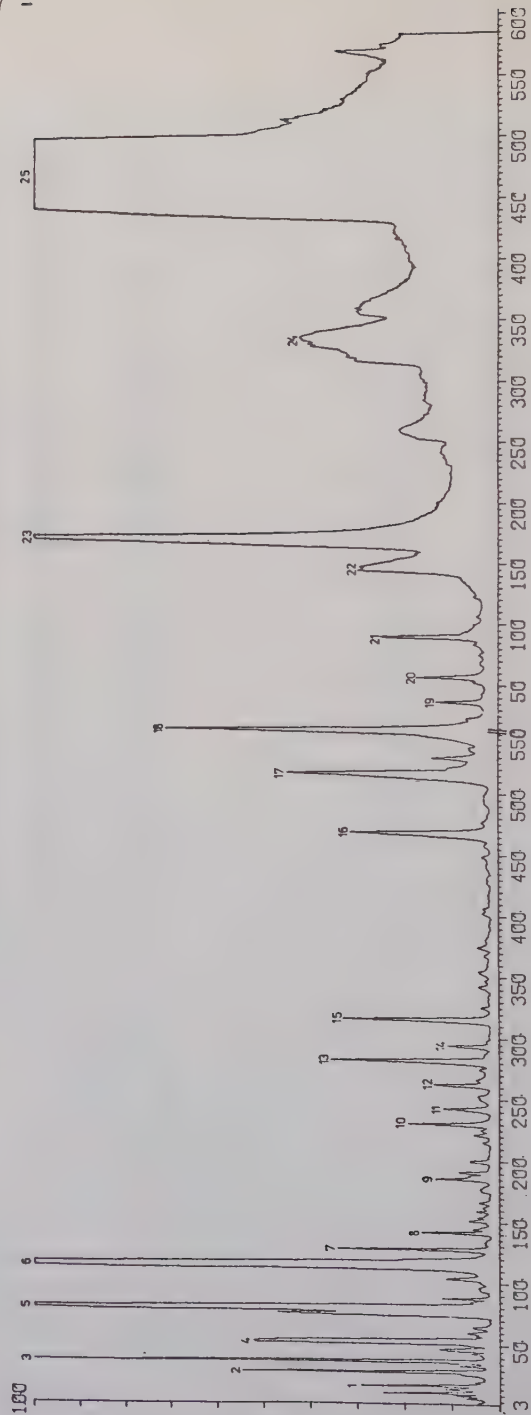


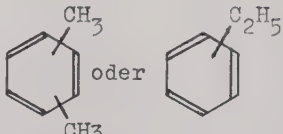
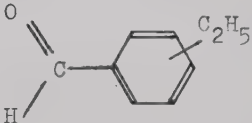
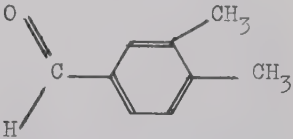
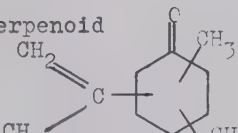
Abb. 9: TIC von C. fusca 211-8a

C. fusca 211-8a

GC-MS: - Einspritzmenge: 2 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 200 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 35-149/1 msec,
150-350/4 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,35	114	i-C ₈ H ₁₈	3-Äthyl-hexan
2	3,63	98	n-C ₇ H ₁₄	n-Hepten
3	3,86	106	C ₈ H ₁₀	 oder
4	4,24	138	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
5	4,96	138	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
6	5,88	138	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
7	6,16	140	i-C ₁₀ H ₂₀	2-Methyl-non-2-en
8	6,52	130	i-C ₈ H ₁₇ OH	2-Äthylhexan-1-ol
9	7,64	154	C ₁₀ H ₁₈ O	Methylketon
10	8.79	134	C ₉ H ₁₀ O	Äthylbenzaldehyd 
11	9,10	134	C ₉ H ₁₀ O	3,4-Dimethylbenzaldehyd 
12	9,61	150	C ₁₀ H ₁₄ O	(Safranal) Monoterpen
13	10,12	152	C ₁₀ H ₁₆ O	Terpenalkohol
14	10,43	164	C ₁₁ H ₁₈ O	sekundärer Alkohol
15	10,99	166	C ₁₁ H ₁₈ O	Terpenoid 

C. fusca 211-8a

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
16	14,91	192	$C_{13}H_{20}O$	α - Jonon
17	16,11	192	$C_{13}H_{20}O$	β - Jonon
18	17,03	212	$n-C_{15}H_{32}$	n-Pentadecan
19	17,82	206	$C_{14}H_{22}O$	?
20	18,33	206	$C_{14}H_{22}O$	?
21	19,20	226	$n-C_{16}H_{34}$	n-Hexadecan
22	20,63	238	$n-C_{17}H_{34}$	n-Heptadecen
23	21,27	240	$n-C_{17}H_{36}$	n-Heptadecan
24	25,46	278	$C_{18}H_{30}O_2$	?
25	29,27	256	$C_{15}H_{31}COOH$	Palmitinsäure

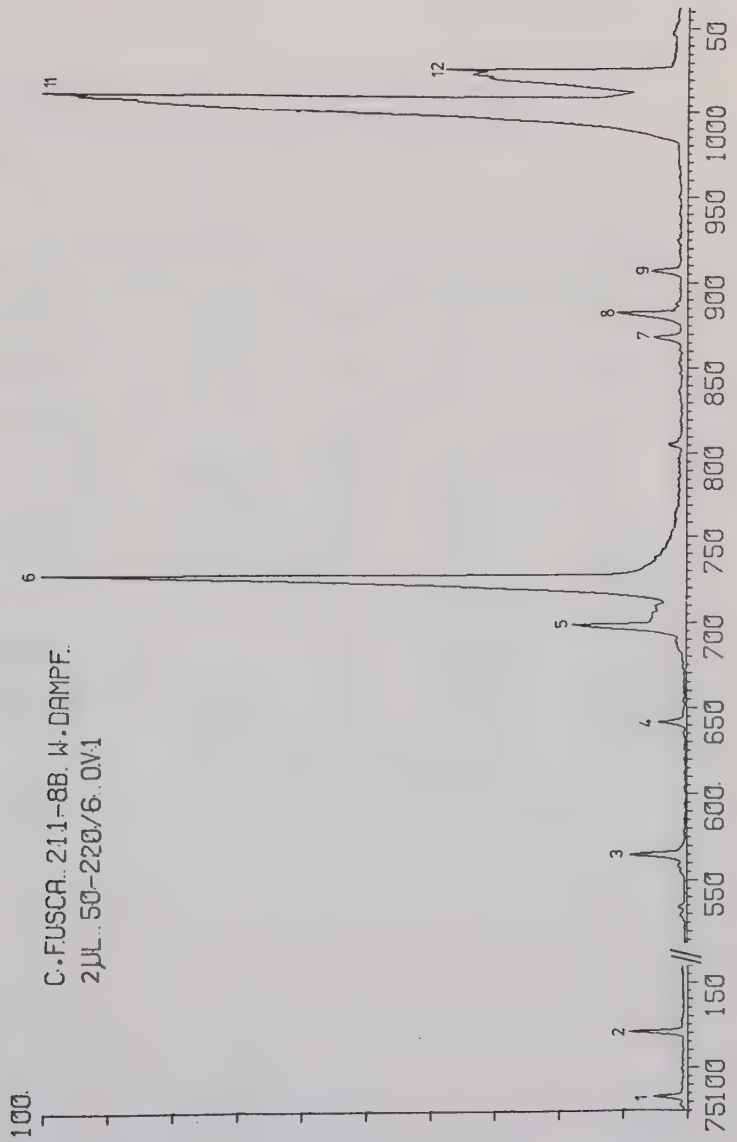


Abb. 10: TIC von *C. fusca* 211-8b

C. fusca 211-8b

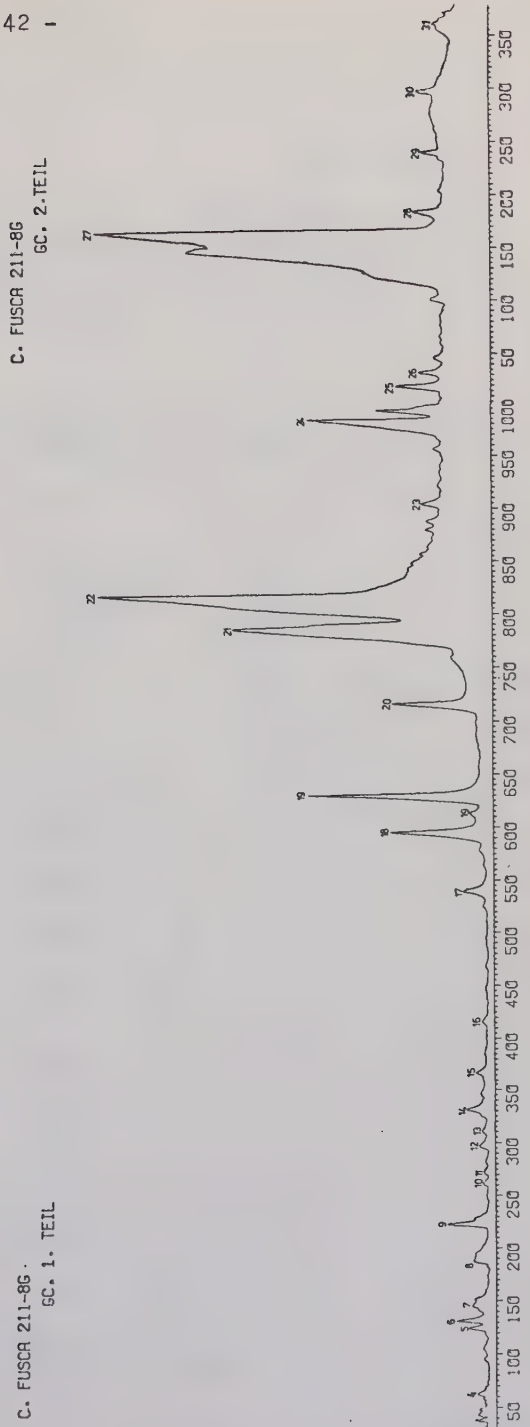
GC-MS: - Einspritzmenge: 2 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 38-149/1 msec,
150-350/4 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	4,81	(138)	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
2	5,78	(138)	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
3	17,13	212	n-C ₁₅ H ₃₂	n-Pentadecan
4	19,10	226	n-C ₁₆ H ₃₄	n-Hexadecan
5	20,71	238	n-C ₁₇ H ₃₄	n-Heptadecen
6	21,19	240	n-C ₁₇ H ₃₆	n-Heptadecan
7	24,88	?	?	?
8	25,23	?	?	Sauerstoff-Verbindung
9	25,87	?	?	Äthylester
11	28,37	?	?	?
12	28,83	?	?	Carbonsäure

Abb. 11: TIC von
C. fusca 211-8g



C. fusca 211-8g

GC-MS: - Einspritzmenge: 2 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-150/1 msec,
151-250/4 msec,
251-298/6 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,00	114	$i\text{-C}_8\text{H}_{18}$	3-Methyl-heptan oder Dimethylhexan
2	3,15	(100)	$n\text{-C}_6\text{H}_{12}\text{O}$	Hexanal
3	3,28	114	$n\text{-C}_8\text{H}_{18}$	(n-Oktan)
4	4,18	114	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}$	Heptanal
5	5,63	138	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}$	Monoterpen (oder 2,4-Nona-dienal)
6	5,77	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	Monoterpen
7	6,06	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	Monoterpen
8	7,09	130	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$	2-Äthyl-hexanol-(1)
9	7,89	142	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	Nonanal
10	8,79	140	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}$	2-Methyl-nonen
11	9,05	?	?	Sauerstoffverbindung
12	9,60	134	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}$	Äthylbenzaldehyd
13	9,95	150	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$	Monoterpen
14	10,41	152	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	Monoterpen
15	11,24	166	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ od. $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}$	?
16	12,37	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	Monoterpen
17	15,21	192	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}$	α-Jonon
18	16,50	192	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}$	β-Jonon

C. fusca 211-8g

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
19	17,31	212	$n-C_{15}H_{32}$	n-Pentadecan
20	19,30	226	$n-C_{16}H_{34}$	n-Hexadecan
21	20,91	238	$n-C_{17}H_{34}$	n-Heptadecen
22	21,54	240	$n-C_{17}H_{36}$	n-Heptadecan
23	23,64	?	?	-methyl-keton
24	25,41	?	?	?
25	26,31	284	$C_{18}H_{36}O_2$	Äthyl-palmitat
26	26,61	296	$C_{21}H_{44}$	Heneicosan
27	29,31	?	?	ungesättigter Äthylester
28	30,12	?	?	gesättigter KW
29	31,41	(322)	$(C_{23}H_{46})$	(Triconten)
30	32,73	(324)	$(C_{23}H_{48})$	(Tricontan)
31	34,16	?	?	?

205V01 CF C-1.1.10
GC OV1

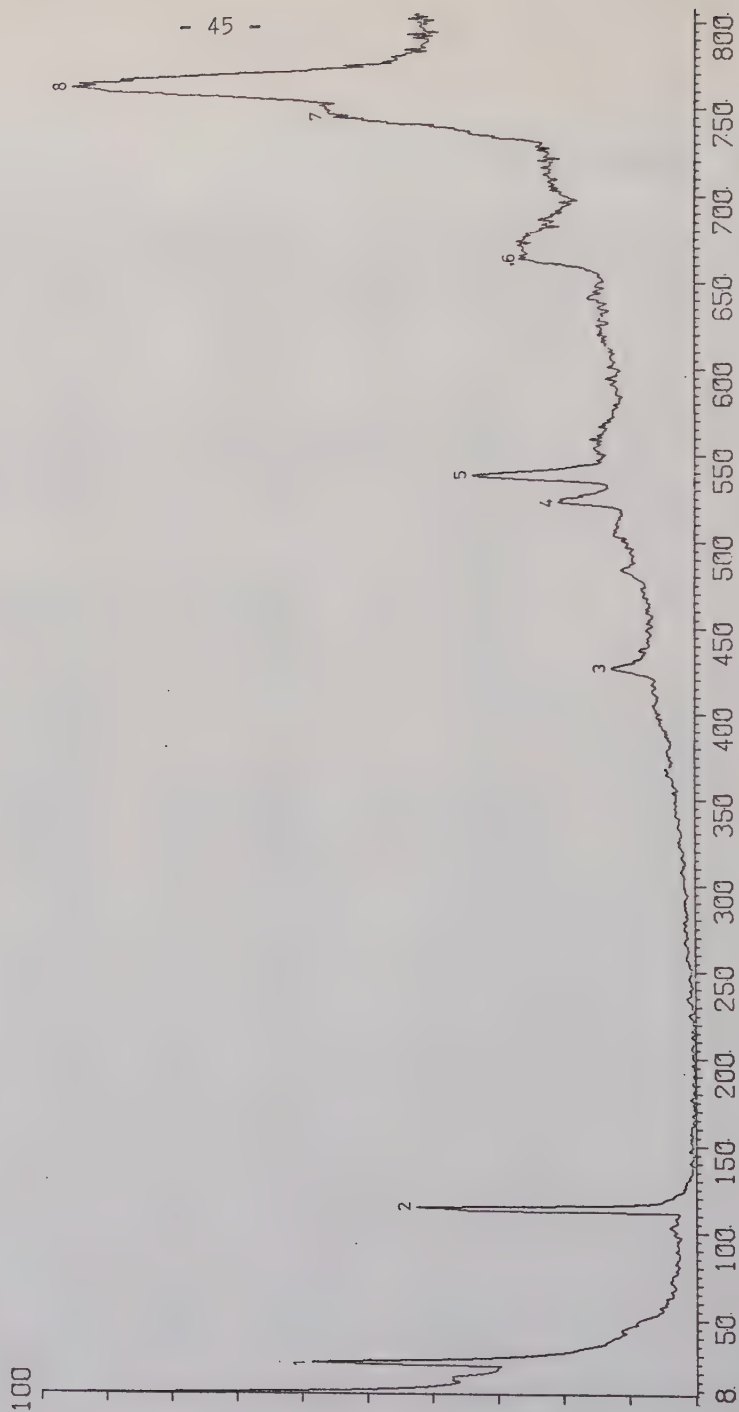


Abb. 12: TIC von *C. fusca* C-1.1.10

C. fusca C-1.1.10

GC-MS: - Einspritzmenge: 2µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-150/3 msec,
151-250/6 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,25	114	i-C ₈ H ₁₈	i-Oktan
2	6,43	140	?	Sauerstoff-Verbindung
3	17,61	(212)	(C ₁₅ H ₃₂)	(Pentadecan)
4	21,04	(238)	(C ₁₇ H ₃₄)	(Heptadecen)
5	21,59	(240)	(C ₁₇ H ₃₆)	(Heptadecan)
6	26,18	?	?	ungesättigte Carbonsäure
7	29,04	256	C ₁₅ H ₃₁ COOH	Palmitinsäure
8	29,72	(264)	?	Carbonsäure

CHL. LUTEOVIRIDIS 211-2R
GC 1. TEIL.

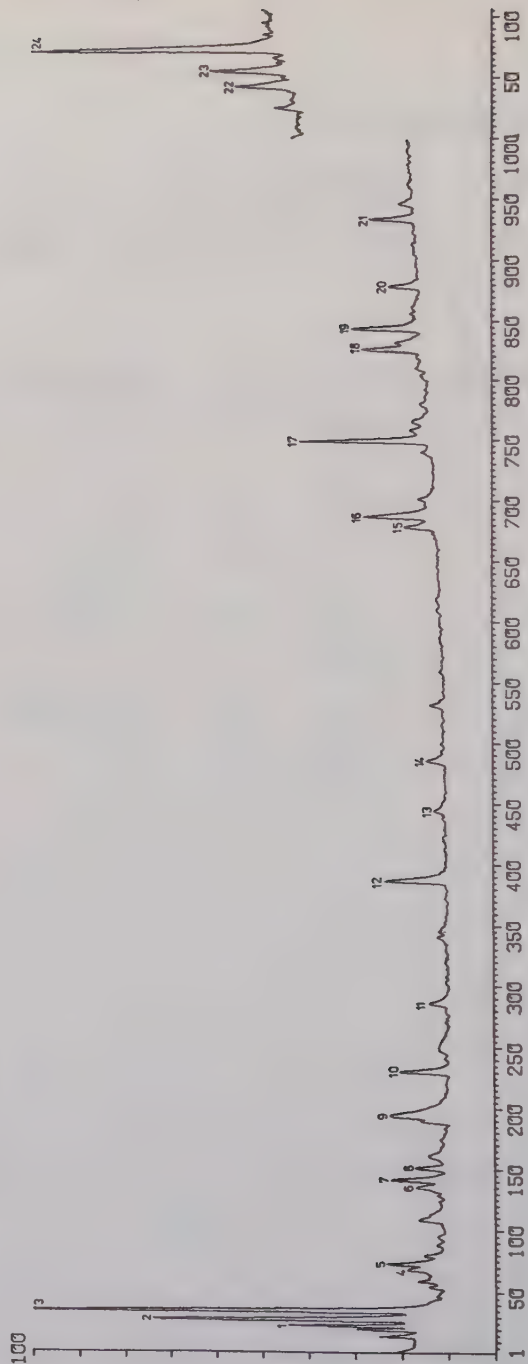


Abb. 13: TIC von *C. luteoviridis* 211-2a

C. luteoviridis 211-2a

GC-MS: - Einspritzmenge: 2 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-150/1 msec,
151-250/3 msec,
251-320/6 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,00	114	i-C ₈ H ₁₈	3-Methyl-heptan Dimethyl-hexan
2	3,12	100	n-C ₆ H ₁₂ O	n-Hexanal
3	3,29	114	i-C ₈ H ₁₈	3-Äthyl-hexan
4	4,08	114	C ₈ H ₁₈	Octan
5	4,20	114	C ₇ H ₁₄ O	Heptanal
6	5,68	138	C ₉ H ₁₄ O od. C ₁₀ H ₁₈	2,4-Nonadienal oder Monoterpen
7	5,83	128	C ₉ H ₁₈ O	Octanal
8	6,09	142	C ₁₀ H ₂₂	Decan
9	7,10	(130)	C ₈ H ₁₈ O	2-Äthyl-hexanol-(1)
10	7,96	(142)	C ₉ H ₁₈ O	Nonanal
11	9,31	(140)	(C ₁₀ H ₂₀)	Olefin
12	11,73	154	C ₁₁ H ₂₂	Undecen
13	13,12	152	C ₁₀ H ₁₆ O	Monoterpen
14	14,10	?	(C ₁₂ H ₂₄)	Olefin
15	18,73	(222)	(C ₁₆ H ₃₀)	Hexadecen
16	18,95	224	n-C ₁₆ H ₃₂	Hexadecen
17	20,46	236	C ₁₇ H ₃₂	Heptadecen
18	22,30	240	C ₁₆ H ₂₂ O	Hexadecanon

C. luteoviridis 211-2a

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
19	22,71	?	?	KW
20	23,55	?	?	-methyl-keton
21	24,87	254	$C_{18}H_{38}$	Octadecan
22	27,55	?	?	KW
23	27,86	?	?	KW
24	28,27	?	?	?

Isomere

524V02 C MIN C-1.1.9

GC 50-220/6 OV1

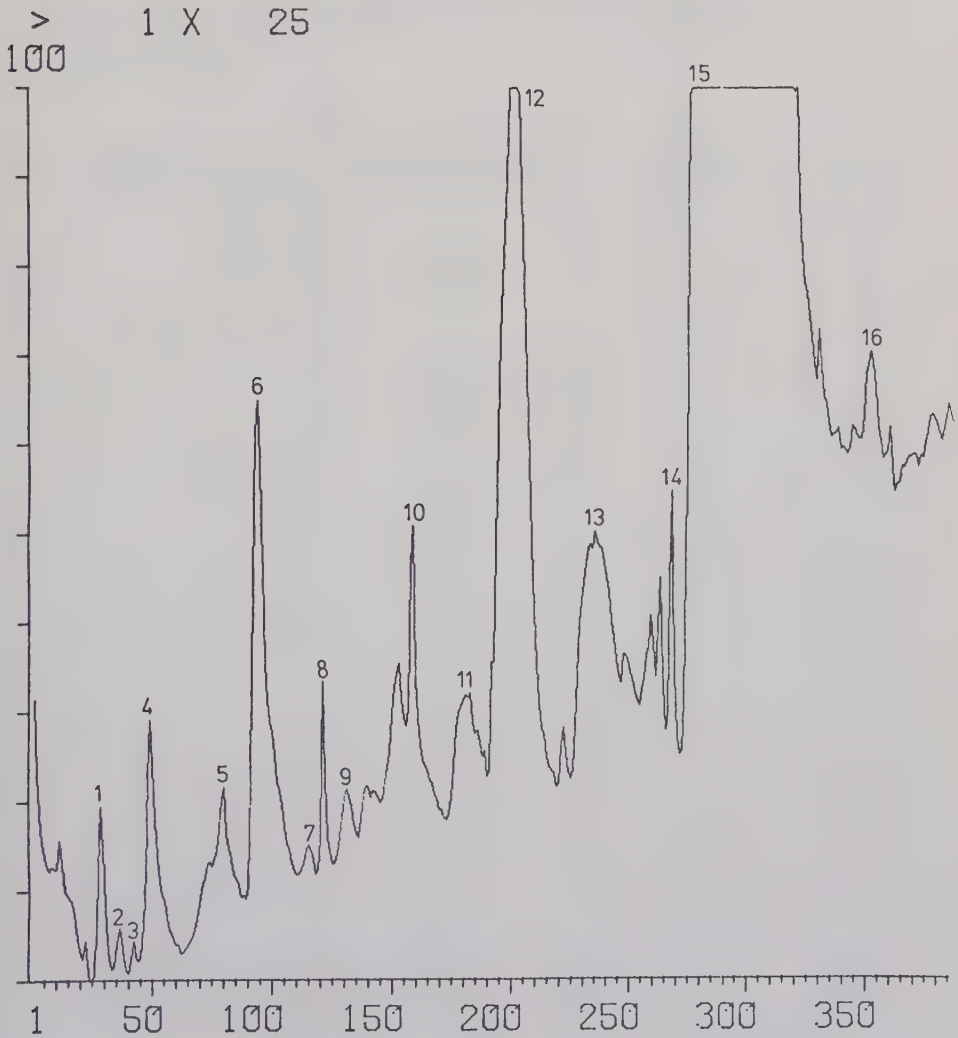


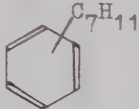
Abb. 14: TIC von C. minutissima C-1.1.9

C. minutissima C-1.1.9

GC-MS: - Einspritzmenge: 2 μ l

- Temperaturprogramm: 50 $^{\circ}$ C - 220 $^{\circ}$ C bei 6 $^{\circ}$ C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-150/8 msec,
151-300/30 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	4,94	136	$C_{10}H_{16}$	Monoterpen
2	5,75	136	$C_{10}H_{16}$	Monoterpen
3	6,36	-	-	TMS
4	7,06	136	$C_{10}H_{16}$	Monoterpen
5	10,19	-	-	TMS
6	11,60	156	$C_{10}H_{20}O$	2-Decanon
7	13,72	184	$C_{13}H_{28}$	Tridecan
8	14,33	-	-	TMS
9	15,33	172	$C_{13}H_{16}$	
10	18,16	-	-	TMS
11	20,48	?	?	Olefin
12	22,50	(238)	$C_{17}H_{34}$	Heptadecen
13	25,93	250	$C_{17}H_{34}O$	-methyl-keton
14	29,26	(196)	?	(primärer Alkohol)
15	32,99	(296)	$(C_{20}H_{40}O)$	(primärer Alkohol)
16	37,73	(278)	?	Phthalester

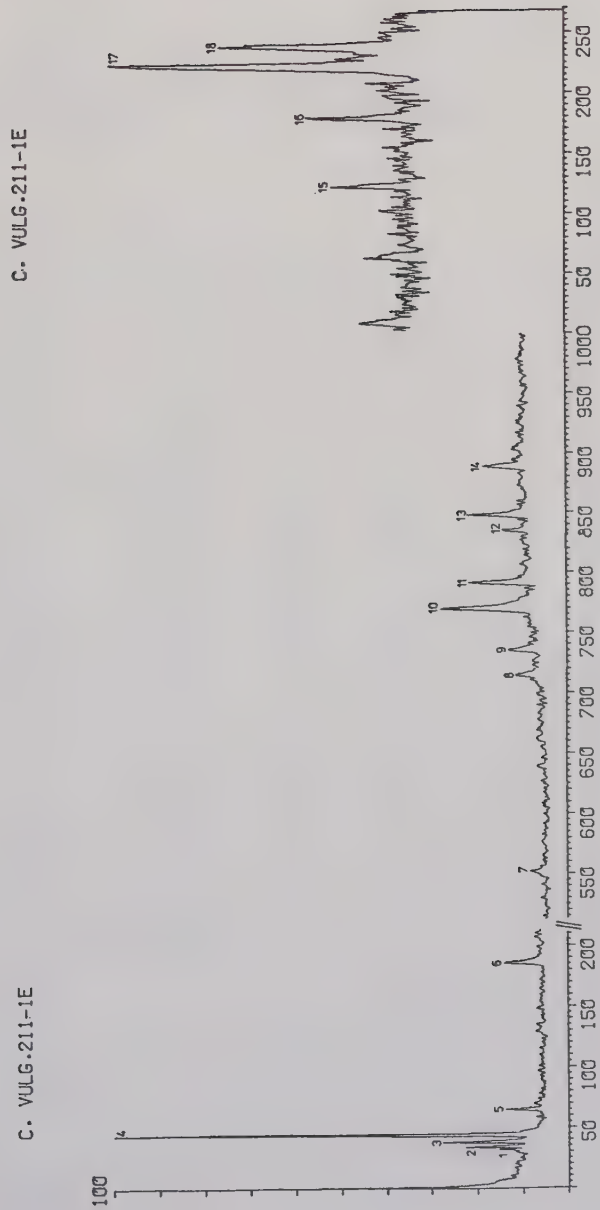


Abb. 15: TIC von *C. vulgaris* 211-1e

C. vulgaris 211-1e

GC-MS: - Einspritzmenge: 4 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

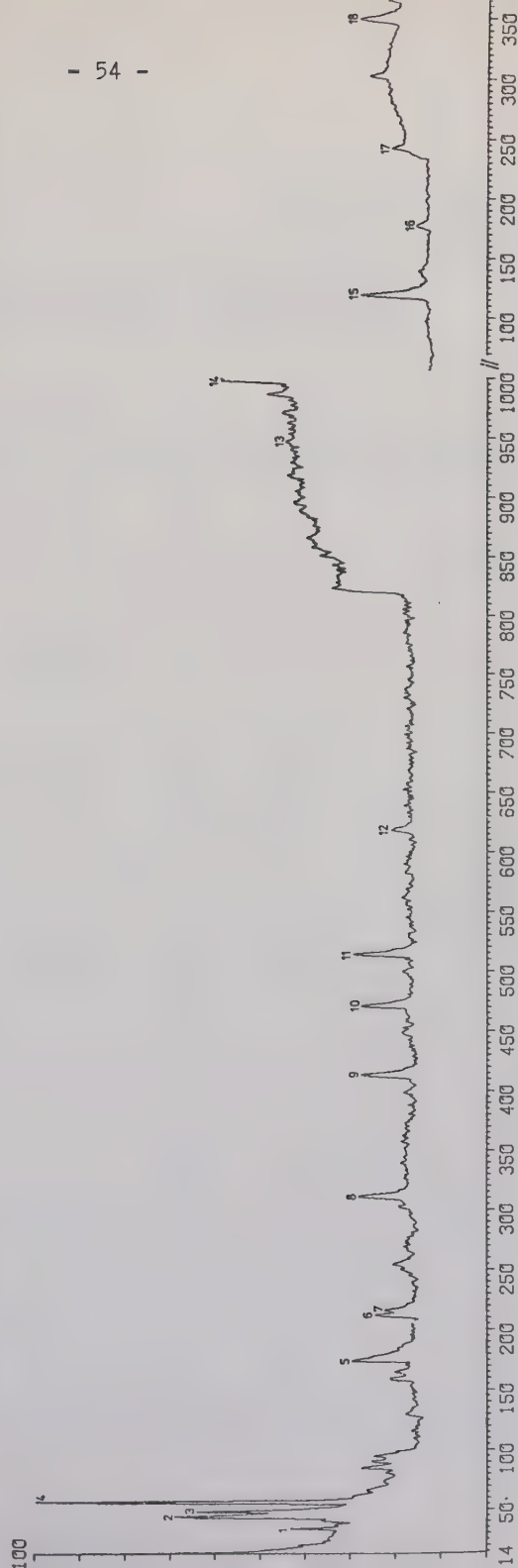
- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-150/1 msec,
151-250/4 msec,
251-320/6 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,10	(114)	i-C ₈ H ₁₈	i-Octan
2	3,15	(114)	i-C ₈ H ₁₈	i-Octan
3	3,26	(100)	(C ₆ H ₁₂ O)	(Hexanal)
4	3,14	114	n-C ₈ H ₁₈	n-Octan
5	3,95	106	C ₈ H ₁₀	Äthylbenzol oder Dimethylbenzol
6	7,03	(130)	(C ₈ H ₁₈ O)	2-Äthyl-hexanol-(1)
7	16,44	192	C ₁₃ H ₂₀ O	β-Jonon
8	20,62	?	?	?
9	21,16	218	C ₁₅ H ₂₂ O	Sesquiterpen
10	22,03	218	C ₁₅ H ₂₂ O	Sesquiterpen
11	22,60	?	?	ungesättigter KW
12	23,73	?	?	ungesättigter KW
13	24,03	268	(C ₁₅ H ₂₉ COOCH ₃)	(Pentadecenylacetat)
14	25,10	?	?	Phthalester
15	31,05	?	?	?
16	32,52	?	?	KW
17	33,62	?	?	?
18	34,00	?	?	Phthalester

Abb. 16: TIC von
C. kessleri 398

C. KESSLERI 398
GC. 1. HAELEFTE

C. KESSLERI 398
GC. 2. HAELEFTE



C. kessleri 398

GC-MS: - Einspritzmenge: 2 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 30-150/1 msec,
151-320/4 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	2,79	92	C ₇ H ₈	Methylbenzol
2	3,03	114	C ₈ H ₁₈	Octan
3	3,12	(100)	C ₆ H ₁₂ O	Hexanal
4	3,31	114	1-C ₈ H ₁₈	3-Äthylhexan
5	6,08	128	C ₈ H ₁₅ OH	Octenol
6	6,92	?	?	ungesättigter KW
7	7,01	(130)	C ₈ H ₁₇ OH	Octanol
8	9,20	(140)	?	Sauerstoffverbindung (Nonenol?)
9	11,62	?	?	?
10	12,95	152	C ₁₀ H ₁₆ O	Monoterpen
11	13,95	(194)	?	KW oder Sauerstoff- verbindung
12	16,37	192	C ₁₃ H ₂₀ O	ß-Jonon
13	24,24	?	?	?
14	25,19	280	?	Sauerstoffverbindung
15	28,05	(296)	(C ₂₀ H ₄₀)	?
16	29,40	?	?	gesättigter Acetat
17	30,91	?	?	gesättigter KW
18	33,40	?	?	?

C. V. F. T. 211-8 K 3JUL

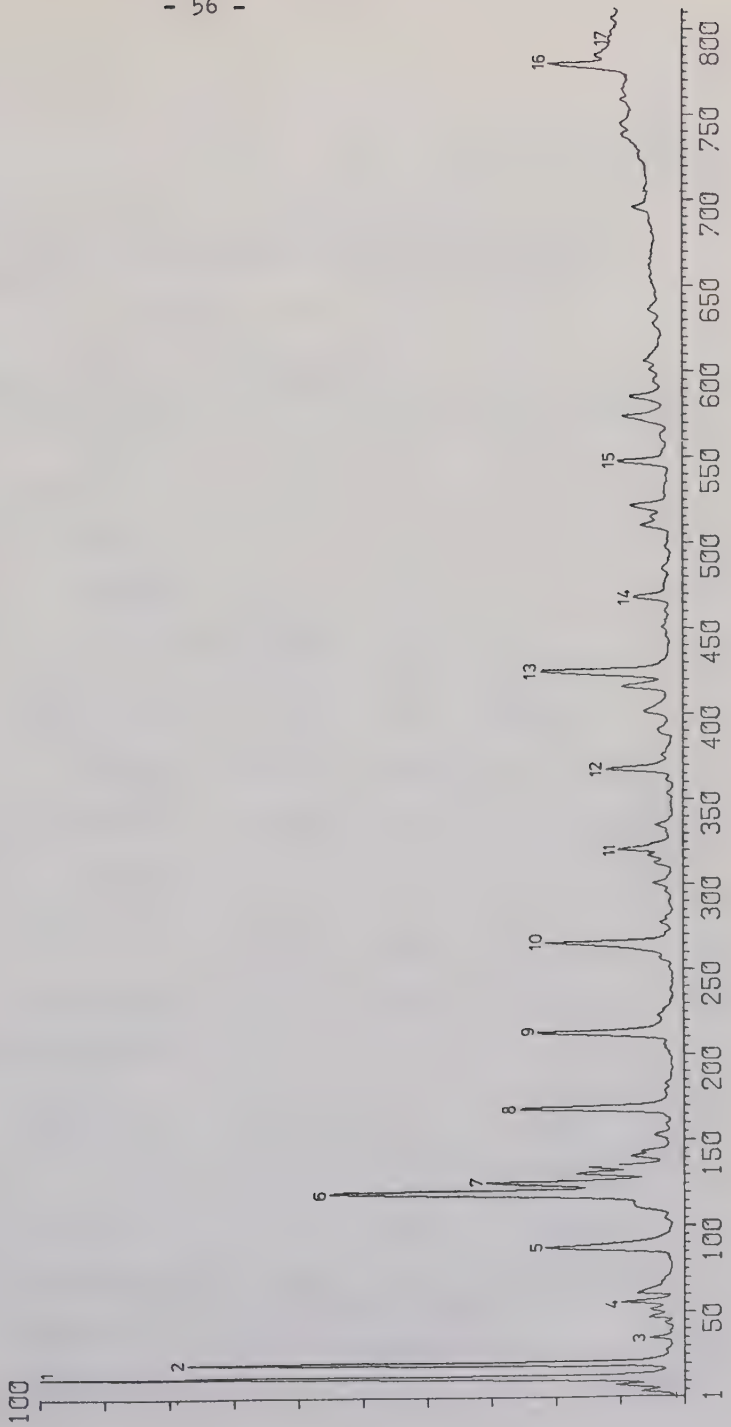


Abb. 17: TIC von *C. sorokiniana* 211-8k

C. sorokiniana 211-8k

GC-MS: - Einspritzmenge: 3 µl

- Temperaturprogramm: 50 °C - 220 °C bei 6 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 30-150/1 msec,
151-320/4 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,00	100	C ₆ H ₁₂ O	Hexanal
2	3,19	114	1-C ₈ H ₁₈	3-Äthylhexan
3	3,52	122	?	Olefin
4	4,00	?	?	Aldehyd
5	4,75	112	C ₈ H ₁₆	Octen
6	5,49	138	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
7	5,63	136	C ₁₀ H ₁₆	Monoterpen
8	6,61	(130)	C ₈ H ₁₈ O	Octanol
9	7,66	(140)	C ₉ H ₁₆ O	Nonadien oder Nonenol
10	8,89	134	?	Olefin
11	10,17	(138)	C ₁₀ H ₁₈	Monoterpen
12	11,27	(136)	(C ₁₀ H ₁₆)	Olefin
13	12,60	152	(C ₁₀ H ₁₆ O)	(Monoterpen)
14	13,60	?	?	Gemisch zweier Verbindungen
15	15,46	?	?	?
16	20,86	240	n-C ₁₇ H ₃₆	n-Heptadecan
17	21,21	-	-	-
18	30,63	228	?	?
19	30,63	256	C ₁₅ H ₃₁ COOH	Palmitinsäure

213V01 C.P. 211-7A

GC 1.TEIL, 80-220/4

213V01 C.P. 211-7A

GC, 2.TEIL 80-220/4

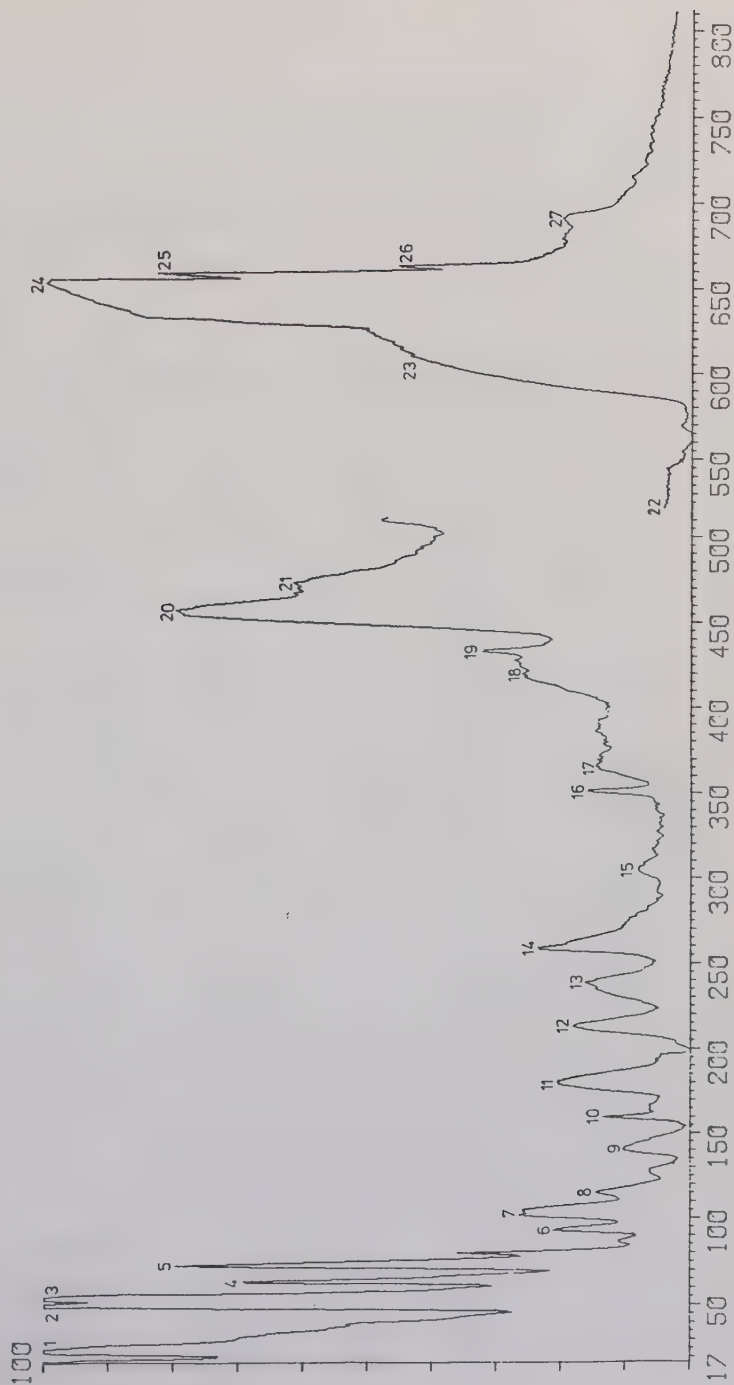


Abb. 18: TIC von *C. protothecoides* 211-7a

C. protothecoides 211-7a

GC-MS: - Einspritzmenge: 4 µl

- Temperaturprogramm: 80°C - 220 °C bei 4 °C/min

- Massenbereiche (m/e) und Scanzeiten: 29-100/3 msec,
101-250/8 msec,
250-320/15 msec.

Peak-Nr.	tr in min	MG	Summenformel	Strukturvorschlag
1	3,37	100	C ₆ H ₁₂ O	Hexanal
2	4,70	138	C ₉ H ₁₄ O	Monoterpen oder 2,4-Nonadienal
3	4,90	130	C ₈ H ₁₇ OH	?
4	5,36 (152,154)	?	?	(Octanal)
5	5,87	128	(C ₈ H ₁₅ OH)	(Octanol)
6	6,89	?	?	?
7	7,45	156	C ₁₀ H ₂₀ O	2-Decanon
8	8,01	?	?	Terpen
9	9,29	?	?	KW
10	10,31	-	-	TMS
11	11,33	?	?	?
12	13,02	198	C ₁₃ H ₂₆ O	2-Tridecanon
13	14,29	?	?	sekundärer Alkohol
14	15,37	-	-	TMS
15	17,71	168	i-C ₁₅ H ₃₀	i-Heptadecen
16	20,06	-	-	TMS
17	20,83 (240)	(240)	(C ₁₇ H ₃₆)	(Heptadecan)
18	23,90	242	C ₁₆ H ₃₃ OH	Hexadecanol
19	24,45	-	-	TMS
20	25,42	250	C ₁₇ H ₃₀ O	?
21	26,29 (252/276)	?	?	?
22	28,79	278	C ₁₉ H ₃₄ O	?
23	33,28	296	?	} Gemisch mehrerer Sauerstoffverbindungen
24	35,33	296	?	
25	35,74	?	?	
26	35,99	290	C ₂₁ H ₃₈	Heneicosen
27	37,42	296	?	?

IV DISKUSSION

Die wachstums- und stoffwechselregulierenden Vorgänge im Organismus werden zum überwiegenden Teil durch die Kern - DNS über Translation und Transkription mittels Enzymen gesteuert. Da die von mir gewählten Anzuchtbedingungen exogene Einflüsse weitgehend ausschalten und alle Algenstämme unter identischen Bedingungen gezogen wurden, kann man davon ausgehen, daß die gewonnenen Ergebnisse auf Unterschiede in der DNS zurückzuführen sind. Aufgabe dieser taxonomischen Arbeit sollte es nicht nur sein, die Einordnung der Organismen anhand der gewonnenen Werte in das vorhandene System vorzunehmen, sondern auch Eigenheiten des jeweiligen Stammes aufzuzeigen und zu dessen Charakterisierung beizutragen.

Bei der ersten Durchsicht von Tabelle 1 und 2 erkennt man eine erstaunliche Inhomogenität der gefundenen Werte. Diese starken Differenzen innerhalb einer Gattung finden eine Deutung in der Arbeit von HELLMANN und KESSLER (1974) über die Basenzusammensetzung der DNS. Bei *Chlorella* ist das prozentuale Verhältnis von Guanin zu Cytosin zwar für die einzelnen Arten charakteristisch, streut aber innerhalb der Gattung von 43% bis 64% (maximal 78%).

POTT und NOVAKOVA (1969) beschrieben die Gattung *Chlorella* morphologisch und teilten sie, übereinstimmend mit den Arbeiten von KESSLER und Mitarbeiter in 10 bzw. 11 Taxa ein. Die Angaben über das durchschnittliche Trockengewicht von Algenzellen eignen sich zur Charakterisierung der Gattung *Chlorella*, da man davon ausgehen kann, daß die von POTT und NOVAKOVA (1969) bestimmten Durchschnittsgrößen mit den Gewichten korrelieren.

Art	TG in pg	Art	TG in pg
<i>C. sorokiniana</i>	0,59	<i>C. luteoviridis</i>	2,66
<i>C. vulgaris</i>	0,68	<i>C. homoshaera</i>	3,16
<i>C. saccharophila</i>	1,44	<i>C. zofingiensis</i>	3,72
<i>C. kessleri</i>	1,63	<i>C. fusca</i> var. rub.	4,42
<i>C. protothecoides</i>	1,70	<i>C. fusca</i> var.	5,28
<i>C. minutissima</i>	2,34	vacuolata	

Tabelle 3: Durchschnittliches Trockengewicht pro Algenzelle in pg.

Aus Tabelle 3 ergibt sich deutlich die Zugehörigkeit von *C. fusca* var. *rubescens* zu *C. fusca* var. *vacuolata*. KESSLER (1972) vermutet, daß *C. vulgaris* durch den Verlust von Hydrogenase und Thermophilie im Laufe der Stammesgeschichte aus *C. sorokiniana* (früher *C. vulgaris* forma *tertia*) hervorgegangen ist. Beide Arten haben nicht nur die geringsten Trockengewichte, sondern differieren im Mittel nur um 0,09 pg, so daß ich eine nahe Verwandtschaft bestätigen kann. Ebenso stehen sich *C. fusca* var. *vacuolata* und *C. fusca* var. *rubescens* als schwerste Algen sehr nahe. *C. minutissima* hingegen ist nicht, wie ihr Name vermuten ließe, die leichteste Alge, sondern liegt mit 2,34 pg genau im Mittelfeld. FOTT und NOVAKOVA (1969) trennen *C. fusca* var. *fusca* 343 wegen ihrer geringen Größe von *C. fusca* var. *vacuolata* ab. Diese Auffassung kann ich bestätigen, da das von mir ermittelte Gewicht von 1,12 pg nur 21% des Durchschnittsgewichtes der übrigen Stämme von *C. fusca* beträgt (Ausnahme: *C. fusca* 211-15, die lediglich 0,97 pg wiegt).

Für *C. saccharophila* C-1.3.1 mit 0,435 pg und *C. saccharophila* 211-1a (2,98 pg) finde ich wie HELLMANN und KESSLER (1974) und VINAYAKUMAR und KESSLER (1975) ein

abweichendes Verhalten zu den übrigen Stämmen, könnte aber 211-1a, entsprechend der Arbeit von KESSLER und SOEDER (1962), auf Grund ihres Gewichtes nicht *C. vulgaris* zuordnen.

C. vulgaris 211-11r und 211-30 wiegen 61% bzw. 215% mehr als die anderen Stämme von *C. vulgaris*. HELLMANN und KESSLER (1974), KESSLER (1974) und VINAYAKUMAR und KESSLER (1975) weisen für beide Stämme ebenfalls ein abweichendes Verhalten für die Merkmale Guanin zu Cytosin-Gehalt, Salzresistenz bzw. Glucosefermentation nach.

Nach KESSLER (1967) und HELLMANN und KESSLER (1974) weicht *C. zofingiensis* C-1.2.1 beim Wachstum im sauren Bereich bzw. im Guanin zu Cytosin-Gehalt erheblich von den übrigen drei Klonen ab. Ihr Gewicht differiert zwar von 211-14a und 211-14c, stimmt aber mit 211-14b recht gut überein. Im Gegensatz zu KESSLER und ZWEIER (1971), HELLMANN und KESSLER (1974) und VINAYAKUMAR und KESSLER (1975), die *C. protothecoides* als eine homogene Art ermittelten, streuen bei meinen Versuchen die Werte der Trockengewichte wie sonst bei keiner Art.

Die Vermehrung von *Chlorella* erfolgt asexuell durch Protoplastenteilung und Schlüpfen der Autosporen aus der Mutterzellwand. Je nach Umweltbedingungen und Art werden 2 bis 64 Tochterzellen freigesetzt, wachsen heran und teilen sich wieder. Bei gleichbleibenden Bedingungen - wie das in unseren "Bioreaktoren" der Fall war - sollten sich während der exponentiellen Wachstumsphase alle Algen je nach Art und Stamm im Mittel in eine gleiche Anzahl von Tochterzellen teilen. Das führt innerhalb dieser Zeit zu einer kontinuierlichen Zunahme der Algenmasse. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 1 für jeden Stamm unter "Zunahme des FG in mg/ml pro Tag" angegeben. Allerdings zeigt sich in diesem Falle, daß die individuelle Entwicklung so unterschiedlich ist, daß keine artspezifischen Werte ermittelt werden können.

Weit weniger stark streuen die nach FOTT (1971) errechneten Beträge für k' . Dieser Wert gibt die Steigung der Geraden im halblogarithmischen Maßstab während des ungehinderten Wachstums an.

Art	k'	Art	k'
<i>C. luteoviridis</i>	0,22	<i>C. minutissima</i>	0,33
<i>C. homosphaera</i>	0,27	<i>C. saccharophila</i>	0,34
<i>C. sorokiniana</i>	0,27	<i>C. fusca</i> var. rub.	0,35
<i>C. zofingiensis</i>	0,28	<i>C. protothecoides</i>	0,39
<i>C. kessleri</i>	0,29	<i>C. vulgaris</i>	0,50
<i>C. fusca</i> var. vac.	0,32		

Tabelle 4: Durchschnittliche Steigung der Geraden während der log - Phase errechnet aus der ZZ nach FOTT (1971)

Sowohl der Gewichtszuwachs als auch k' sind kaum für eine Abklärung taxonomisch strittiger Stämme innerhalb einer Art zu verwerten. Vielmehr sind sie geeignet, bei der Anzucht von Algen eine Voraussage über die zu erwartende Ausbeute zu machen, wenn etwa Wert auf schnelle Zuwachsraten bei Synchronkulturen oder auf hohe Erträge gelegt wird. Trotz aller Einschränkungen erkennt man einen artspezifischen Unterschied für den Wert k' , wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist. An dieser Stelle sei noch auf die Arbeit von KESSLER (1972) hingewiesen, in der *C. sorokiniana* 211-18 wegen ihres geringen und langsamen Wachstums als Versuchsobjekt untauglich war; im Fermenter zeigte sie ein durchaus normales Verhalten und lag mit Massezuwachs und Vermehrungsrate im Durchschnittsbereich.

Anders als die reinen Wachstumsparameter folgen die Werte für das Gesamt-Chlorophyll und das Verhältnis von Chl. a:b weitgehend der taxonomischen Klassifizierung. Trotzdem zeigen sie eine gewisse Unabhängigkeit voneinander, wie Tabelle 5 veranschaulicht:

Art	ges. Chl.	Chl. a:b
<i>C. minutissima</i>	1,35 (1)	3,20 (6)
<i>C. zofingiensis</i>	1,47 (2)	2,64 (3)
<i>C. protothecoides</i>	1,49 (3)	3,01 (4)
<i>C. saccharophila</i>	1,59 (4)	3,37 (7)
<i>C. luteoviridis</i>	1,97 (5)	2,61 (2)
<i>C. fusca</i> var.vac.	2,27 (6)	3,20 (6)
<i>C. fusca</i> var.rub.	2,65 (7)	3,12 (5)
<i>C. homosphaera</i>	2,65 (8)	2,32 (1)
<i>C. vulgaris</i>	2,83 (9)	3,97 (10)
<i>C. kessleri</i>	4,97 (10)	3,52 (8)
<i>C. sorokiniana</i>	4,98 (11)	3,93 (9)

Tabelle 5: Mittlerer Gesamtchlorophyllgehalt in $\text{mg/ml} \cdot 10^{-2}$ und das Verhältnis von Chl.a : Chl.b, in Klammer Stellenwertung.

Bestätigt wird wiederum die nahe Verwandtschaft von *C. vulgaris* und *C. sorokiniana*; beide Arten haben neben *C. kessleri* die höchsten Chlorophyllwerte und a:b - Verhältnisse. Ebenso liegen die Werte von *C. fusca* var. *vacuolata* und *C. fusca* var. *rubescens* so dicht beieinander, daß ihre taxonomische Zusammengehörigkeit bestätigt werden kann. *C. fusca* 343 fügt sich mit ihren Werten für Chlorophyllgehalt und TG ohne weiteres in die Art ein. Dagegen weicht der Wert bei *C. fusca* 211-15 für den Gesamtchlorophyllgehalt erneut stark vom Mittel-

wert ab, entsprechend der Einteilung nach FOTT und NOVA-KOVA (1969), die 211-15 zur var. *vacuolata* stellen.

Weniger beim Gesamtchlorophyllgehalt als vielmehr beim a:b - Verhältnis differieren *C. saccharophila* 211-1a und C-1.3.1 extrem stark vom Mittelwert. Dies bestätigt das Ergebnis von HELLMANN und KESSLER (1974), deckt sich aber nicht mit der von KESSLER und SOEDER (1962) vorgenommenen Zuordnung.

C. zofingiensis C-1.2.1 korreliert diesmal abweichend vom TG mit 211-14c.

C. vulgaris 211-11r stimmt nur im Gesamtchlorophyllgehalt mit den übrigen Stämmen überein, während sie beim Chlorophyll a:b - Verhältnis, zusammen mit *C. vulgaris* 211-30, die geringsten Werte aufweist. Interessanterweise haben beide Zoochlorellen *C. sorokiniana* 211-40a und 211-40c bei weitem den höchsten Chlorophyllgehalt und erreichen auch mit dem a:b - Verhältnis Spitzenwerte.

Im übrigen stellt *C. protothecoides* auch hier wie schon beim Trockengewicht die uneinheitlichste Art dar, bei der die Werte zwischen 0,45 und $3,27 \cdot 10^{-2}$ mg Chl/ml bzw. zwischen 2,39 und 4,12 beim Verhältnis von Chlorophyll a:b streuen.

Mit Einführung der Gaschromatographie nahm die Aufklärung der Fettanteile von Organismen einen mächtigen Aufschwung. In der Zeit davor waren die Untersuchungen wesentlich aufwendiger und führten oftmals zu Irrtümern (IWATA et al. (1961) und IWATA et al. (1963)). Eine Vielzahl von Autoren untersuchten mit beträchtlichem Erfolg die Pflanzenwachse. So gelang es NORDBY und NAGY (1974), durch Vergleich der langkettigen KW eine Taxonomie für Citrusarten aufzustellen, und STRANSKY und Mitarbeiter (1967) verglichen Wachse von Pflanzen unterschiedlicher Organisationshöhe anhand der n-Alkane. STRANSKY und Mitarbeiter (1968) und VELEV und

Mitarbeiter (1972) untersuchten die KW-Fractionen bei Scenedesmus und fanden übereinstimmend n-Heptadecan mit 54,4% bzw. 33,8% als Hauptkomponente. GELPI und Mitarbeiter (1970) untersuchten präkambrische Sedimente auf KW fossiler Algen und fanden übereinstimmende KW-Muster mit rezenten Grün- und Blaualgen. Die genannten Autoren verfügten über große Mengen an Ausgangsmaterial; so konnten sie die Extrakte z.T. komplizierten Trennverfahren unterwerfen und hatten zum Schluß ein reines KW-Gemisch.

KOLATTUKUDY (1969), der Pflanzenwachse untersuchte, fand neben den Hauptkomponenten KW, Wachsester, freien Alkoholen und Fettsäuren in geringerem Maße auch Ketone, sekundäre Alkohole, Aldehyde, Terpene und Flavone. Primärprodukte sind die Fettsäuren, bei Algen hauptsächlich Palmitinsäure ($C_{15}H_{31}COOH$), woraus durch Kettenverlängerung und anschließende Decarboxylierung die Alkane hervorgehen. Andererseits entstehen durch Reduktion der Fettsäuren Aldehyde, die wiederum zu Alkoholen reduziert werden können.

Von jedem Chlorellastamm wurde ein GC angefertigt; jeder Peak repräsentiert eine Verbindung. Da Auf- und Umbauvorgänge enzymatisch gesteuert werden, die Enzyme aber direkte Produkte der DNS sind, kann man annehmen, daß für jede im GC aufgetrennte Substanz ein Genort vorliegen muß. Tabelle 2 Rubrik "Peaks" weist diejenigen Signale aus, deren Flächen größer als 0,1% der Fläche aller Peaks sind.

<i>C. saccharophila</i>	26	<i>C. luteoviridis</i>	27
<i>C. homosphaera</i>	24	<i>C. sorokiniana</i>	27
<i>C. minutissima</i>	25	<i>C. vulgaris</i>	28
<i>C. zofingiensis</i>	26	<i>C. kessleri</i>	35
<i>C. protothecoides</i>	26	<i>C. fusca</i> var.rub.	37
<i>C. fusca</i> var.vac.	27		

Tabelle 6: Mittlere Zahl der Peaks pro GC

Im Mittel haben 8 von 11 Arten zwischen 24 und 28 verschiedene Verbindungen im Wasserdampfextrakt, nur *C. kessleri* und *C. fusca* var. *rubescens* sind mit 35 bzw. 37 verschiedenen Substanzen reicher an Inhaltsstoffen. Eine nahe Verwandtschaft besteht lediglich zwischen *C. fusca* 211-8a und *C. fusca* var. *rubescens* mit jeweils 37 Peaks. Die größte Streubreite zeigt sich bei der Anzahl der Signale nicht bei *C. protothecoides*, sondern bei *C. vulgaris* und *C. sorokiniana*, während *C. zofingiensis* und *C. kessleri* (eine Ausnahme bildet C-1.2.2) ein homogenes Bild bieten.

Betrachtet man den prozentualen Anteil des gewonnenen Extraktes in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Algentrockengewichtes (Tabelle 2), so zeigt sich eine überraschend starke Artspezifität.

<i>C. kessleri</i>	0,084	<i>C. sorokiniana</i>	1,011
<i>C. fusca</i> var. <i>rub.</i>	0,203	<i>C. vulgaris</i>	1,097
<i>C. fusca</i> var. <i>vac.</i>	0,274	<i>C. luteoviridis</i>	1,276
<i>C. zofingiensis</i>	0,582	<i>C. protothecoides</i>	1,444
<i>C. minutissima</i>	0,695	<i>C. saccharophila</i>	1,655
<i>C. homosphaera</i>	0,879		

Tabelle 7: Mittlere Menge des Gesamtextraktes

Der Extrakt von *C. kessleri*, der Art mit durchschnittlich 35 verschiedenen Verbindungen, ergibt nur 0,084% des TG. Eine deutliche Verwandtschaft zeigt sich einmal mehr zwischen *C. fusca* var. *vacuolata* und *C. fusca* var. *rubescens* und zwischen *C. sorokiniana* und *C. vulgaris*. Im Gegensatz zu *C. kessleri* hat zwar *C. saccharophila* die geringste Anzahl von Verbindungen im Extrakt, dafür aber die höchste Ausbeute.

C. fusca 343 fügt sich ebenso gut in die Art *C. fusca*

ein wie 211-15. Erneut fallen *C. saccharophila* 211-1a und C-1.3.1 aus dem sonst homogenen Feld der übrigen Klone heraus, was den Befunden von HELLMANN und KESSLER (1974) und VINAYAKUMAR und KESSLER (1975) entspricht.

C. zofingiensis C-1.2.1 übertrifft diesmal allein die Werte der übrigen drei Stämme, was mit KESSLER (1967) und HELLMANN und KESSLER (1974) übereinstimmt und eine Abspaltung von *C. zofingiensis* rechtfertigen würde.

Wie beim Chlorophyll a:b - Verhältnis korrelieren die Werte, die die Inhaltsstoffe betreffen, bei *C. sorokiniana* 211-40a und 211-40c in auffallender Weise. Ansonsten differieren die Ergebnisse bei *C. protothecoides* wieder beträchtlich, nämlich zwischen 0,352 % und 2,47 % (Tabelle 2).

Schlüsselt man die im GC getrennten n-Alkane nach ihrem prozentualen Anteil am Gesamtextrakt auf, so ergeben sich Werte, die für eine chemotaxonomische Klassifizierung der Gattung *Chlorella* wenig geeignet erscheinen. Jeder Stamm hat seinen charakteristischen Anteil an n-Heptadecan und davon ausgehend in abnehmender Menge ungeradzahlige Homologe. Bei einigen Algen ist dieses Maximum entweder zum n-Pentadecan oder zum n-Nonadecan hin verschoben.

Da es sich bei diesen Substanzen - Alkane und Palmitinsäure - um Intermediärprodukte des Stoffwechselgeschehens handelt, die nach KOLATTUKUDY (1969) zum Teil Membranbestandteile sind und während der Individualentwicklung öfter umgebaut werden, ist diese große Variabilität nicht weiter verwunderlich. Eine Klärung der Frage, zu welchem Zeitpunkt der Zellentwicklung bestimmte Verbindungen gebildet werden, dürfte sich vermutlich nur anhand von Synchronkulturen beantworten lassen. Dennoch möchte ich eine vorsichtige Interpretation der gefundenen Werte wagen.

Einmal erscheint mir bemerkenswert, daß nur bei *C. fusca* C-1.1.10 keine Palmitinsäure zu finden ist und die

Alkane 4 % des Gesamtextraktes ausmachen, was ihre Zuordnung nach FOTT und NOVAKOVA (1969) zu *C. fusca* var. *vaucolata* rechtfertigen könnte. Zum anderen fällt auf, daß *C. saccharophila* und *C. luteoviridis*, gemessen an den übrigen Arten, einen relativ hohen Gesamt-n-Alkan-Anteil aufweisen, wobei unter anderen *C. saccharophila* 211-1a aus dem Rahmen fällt. Das ließe sich vielleicht mit der hohen Salzresistenz beider Arten (KESSLER (1972)) erklären, da nach KOLATTUKUDY (1969) die Hauptmenge pflanzlicher Lipide in die Zellmembranen eingebaut ist. *C. protothecoides* verträgt zwar auch 4% NaCl, weist dagegen nur eine geringe n-Alkanmenge auf, dafür aber einen extrem hohen Palmitinsäuregehalt.

Außerdem ist der extrem niedrige Anteil der n-Alkane bei *C. kessleri*, *C. sorokiniana* und *C. protothecoides* bemerkenswert, was auf der anderen Seite ebenfalls durch einen hohen Gehalt an Palmitinsäure kompensiert zu werden scheint.

n-Alkane und Palmitinsäure zusammen betragen im Durchschnitt zwischen 40 % und 66 % des Gesamtextraktes, so daß für die übrigen Inhaltsstoffe ein recht unterschiedlicher Spielraum bleibt. Darauf soll noch in der Diskussion der Massenspektren eingegangen werden.

LIERSCH (1976) kam bei der Untersuchung des ätherischen Öls der Gattung *Chlorella* zu anderen Ergebnissen als in Tabelle 2 unter der Rubrik "Gesamtextrakt" angegeben. Das lag sowohl an den von ihm gewählten Anzuchtbedingungen als auch an der geringen Algenmenge (aus 250 ml NM).

Eine Analyse der Gaschromatogramme über die n-Alkane und die Palmitinsäure hinaus scheiterte an den Vergleichssubstanzen, die entweder sehr kostspielig oder überhaupt nicht erhältlich sind. Um dennoch zu einem befriedigenden Ergebnis zu kommen, durfte ich freundlicherweise das Massenspektrometer mit gekoppeltem Gaschromatographen am Institut für Organische Chemie II benutzen. Auf diese Weise konnte ich einen Teil der

übrigen Extraktanteile aus 10 Stämmen aufklären. Für eine vollständige Identifizierung der einzelnen Verbindungen wären aber auch in diesem Falle die Originalsubstanzen erforderlich gewesen. Ein sicherer Nachweis gelang nur dann, wenn mehr als 50 µg Substanzmenge pro µl Lösungsmittel vorlagen.

Trotz gut sichtbarer Peaks, manchmal mit mehr als 20 % Intensität, war eine vollständige Aufklärung des Massenspektrums nicht möglich. Die Ursache liegt im Computer des Massenspektrometers, der das größte Signal im TIC auf 100 % normiert und alle anderen Peaks im prozentualen Verhältnis dazu streckt. Deshalb kann man die Mengen zweier verschiedener Algen aufgrund der Peakflächen nicht miteinander vergleichen. So zeigte beispielsweise das TIC von *C. sorokiniana* 211-8k mehr als 30 einzelne Signale, wovon aber nur 7 sicher anzusprechen waren, 8 weitere konnte man nur noch klassifizieren. Die restlichen Massenspektren waren so lückenhaft, daß jede weitere Aussage einer Spekulation gleichkäme. Vergleicht man diese Erkenntnis mit den Werten für *C. sorokiniana* 211-8k aus Tabelle 2, so stellt man fest, daß von der eingesetzten Trockenmasse nur 0,408 % als extrahierbares Material übrigbleiben. Es treten zwar 24 Peaks auf, doch vereinigen die n-Alkane mit Palmitinsäure (5 Peaks) bereits 55,7 % des Gesamtextraktes auf sich. Folglich teilen sich die restlichen 19 Peaks in die verbleibenden 44,3 %.

Daß man ein gutes TIC mit dem dazugehörenden vollständigen GC vergleichen kann, beweist Abb. 15. Gleichzeitig erkennt man die bessere Trennleistung der Kapillarsäule im Bereich der niedrig siedenden Anteile und die bessere Auftrennung in der gepackten Säule im Hochtemperaturbereich.

Von 10 untersuchten Stämmen hatten nur 4 soviel Substanz, daß neben den regelmäßig vorkommenden niedrigsiedenden Anteilen und höheren Alkanen auch inter-

essante Verbindungen identifiziert werden konnten. Oftmals war das Molekülion (M^+) nicht aufzufinden; dennoch ließ sich anhand der Fragmente und Massendifferenzen eine genaue Aussage über die jeweilige Substanz machen. Der extrapolierte Wert wurde in der Rubrik "MG" eingeklammert, ebenso auch strittige Summenformeln und Strukturvorschläge, wenn eine weitere Möglichkeit nicht auszuschließen war. Ein Fragezeichen steht für ein nicht aufklärbares Massenspektrum.

Von den regelmäßig wiederkehrenden Verbindungen sind in Abb. 6 das Massenspektrum von n-Heptadecan und von Palmitinsäure dargestellt. Stellvertretend für die sel-
teneren Substanzen steht in Abb. 5 das α - bzw. das β -Jonon, aufgenommen aus dem Extrakt von *C. fusca* 211-8a.

In den Gaschromatogrammen tauchten einige Gipfel regelmäßig auf. So steht beispielsweise dicht vor dem n-Heptadecan immer ein Peak, der sich im GC-MS als n-Heptadecen ($n-C_{17}H_{34}$) entpuppte. Ferner tritt im TIC sehr häufig das n-Hexadecan ($n-C_{16}H_{34}$) als größtes und meist einziges Signal der Reihe der geradkettigen KW auf (Peak 21 in Abb. 3,4,7,8 und 9). Höhere Alkane sind selten anzutreffen. n-Heneicosan ($n-C_{21}H_{44}$) findet man noch bei *C. fusca* 211-8g und bei *C. protothecoides* 211-7a, $C_{18}H_{38}$ (Octadecan) bei *C. luteoviridis* 211-2a. Ansonsten tritt bei vollständigen TIC das n-Heptadecan ebenso regelmäßig auf wie die Palmitinsäure, deren oft überraschter Peak z.T. schwer zu identifizieren ist, da er noch andere Substanzen mit aufnimmt, was ein gemischtes Massenspektrum ergibt.

So kann man mit einigem Vorbehalt das TIC mit dem FID-Gaschromatogramm vergleichen (Abb. 7 und 8) und ohne Testsubstanzen das Chromatogramm weiter aufschlüsseln. *C. fusca* 211-8a und 211-8g und *C. luteoviridis* 211-2a sind die Algen mit dem differenziertesten Spektrum: neben Paraffinen, Olefinen und Palmitinsäure gibt es Aldehyde, Ketone, Alkohole, Ester und Terpene. Letztere

treten in 9 von 10 Algen auf, wobei die Monoterpene eindeutig überwiegen. Lediglich bei *C. vulgaris* 211-1e erscheinen statt dessen zwei Sesquiterpene mit einem MG von 218, einer Retentionszeit von 21,16 bzw. 22,03 min und der Summenformel $C_{15}H_{22}O$. VELEV (1973) findet in *Scenedesmus acutus* (Meyen) Chod. 8, Tomasselli in der "Fraktion der aliphatischen Terpen- und der aromatischen Alkohole" das Farnesol (MG 222). Ich untersuchte den Algenextrakt daraufhin dünn-schicht-chromatographisch entsprechend der Vorschrift von STAHL. Der Extrakt lief auf einer Kieselgelplatte mit Benzol-Äthylacetat (80+20). Nach beendeter Chromatographie wurde der Fleck, der denselben R_f - Wert hatte wie das mitgelaufene Farnesol, ausgekratzt, eluiert und zweimal massenspektrometrisch untersucht. Trotz eines zusätzlich angefertigten Massenfragmentogramms konnte kein Farnesol gefunden werden.

Weder die beiden Sesquiterpene von *C. vulgaris* 211-1e noch alle übrigen Monoterpene konnten aufgeklärt werden, da zum einen in den Spektrenatlanten keine gleichen oder ähnlichen Spektren abgebildet und zum anderen keine Vergleichssubstanzen vorhanden waren.

Hier sind in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig, da die Terpene eine interessante Naturstoffklasse darstellen. Ob das Nährmedium, insbesondere die Stickstoffquelle, oder sonstige Wachstumsparameter auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe einen Einfluß haben, werden erst weiterführende Versuche ergeben.

V ZUSAMMENFASSUNG

Von 88 Stämmen der Gattung *Chlorella*, die unter standardisierten Bedingungen wuchsen, wurden die Wachstumsparameter aufgenommen: Zunahme des FG und Steigung der Geraden während der log-Phase.

Außerdem wurden für jeden Stamm der Gesamtchlorophyll-Gehalt, das Verhältnis von Chlorophyll a:b und das Trockengewicht bestimmt.

Am Ende der log-Phase wurden die Algen abgeerntet und der Wasserdampf-Destillation unterworfen. Die Untersuchung des Extraktes erfolgte gaschromatographisch und massenspektroskopisch. Alle gefundenen Daten wurden auf ihre taxonomische Verwendbarkeit hin geprüft und einem kritischen Vergleich mit bereits durchgeführten Arbeiten unterzogen.

TG, Gesamtchlorophyll-Gehalt, das Verhältnis von Chlorophyll a:b, Gesamtextraktmenge und mit einigen Einschränkungen die Zahl der Peaks pro Chromatogramm eignen sich zur taxonomischen Bewertung der einzelnen *Chlorellastämme*. Die reinen Wachstumsparameter k' und die Zunahme des Frischgewichtes, sowie die Verteilung der n-Alkane und der Anteil der Palmitinsäure, besitzen nur individuelle Aussagekraft. Mit ihrer Hilfe kann man Voraussagen machen über das Wachstumsverhalten bzw. über die Menge der zu untersuchenden Inhaltsstoffe.

Die bestehende taxonomische Einteilung der Gattung *Chlorella*, wie sie von KESSLER und Mitarbeiter und von FOTT und NOVAKOVA konzipiert wurde, kann mit den hier gewonnenen Werten bestätigt werden. Darüber hinaus wurde aus 10 *Chlorellastämmen* eine Anzahl wasserdampfextrahierter Substanzen gaschromatographisch und massenspektroskopisch identifiziert.

Gefunden wurden neben Paraffinen, Olefinen, Alkoholen, Aldehyden und Ketonen eine große Anzahl von Monoterpenen und 2 Sesquiterpene. Ihre Identifizierung gelang nicht und bleibt einer späteren Untersuchung vorbehalten.

VI LITERATUR

BOARDMAN N.K., ANDERSON J.M., BJÖRKMAN O., GOODCHILD D.J.,
GRIMME L.H. and THORNE S.W.:

"Chloroplast Differentiation in Sun and Shade
Plants: Relationship between Chlorophyll Con-
tent, Grana Formation, Photochemical Activity
and Fractionation of the Photosystems."
Div. of Plant Industry, CSIRO, Canberra

BÖGER P.: "Das Strukturproteid aus Chloroplasten einzelliger
Grünalgen und seine Beziehung zum Chlorophyll"
Flora 154, 174(1964)

BUDZIKIEWICZ H.:

"Massenspektrometrie" Verlag Chemie (1972)

DAB 7 "Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe"
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
Stuttgart (1967)

DaSILVA E.J. and GYLLENBERG H.G.:

"A taxonomic treatment of the Genus Chlorella
by the technique of continous classification"
Arch. Mikrobiol. 87, 99(1972)

DUDLEY P.A. and ANDERSON R.E.:

"Separation of Polyunsaturated Fatty Acids by
Argentation Thin Layer Chromatography"
Lipids 10, 113(1975)

FEDTKE C.: "Effects of the Herbicide Methabenzthiazuron
on the Physiology of Wheat Plants"
Pestic. Sci. 4, 653(1973)

FOTT B.: "Algenkunde"

G.Fischer Verlag, Stuttgart (1971)

FOTT B. and NOVAKOVA M.:

"A monograph of the genus Chlorella. The fresh
water species. In: Studies in Phycology"
Ed.B.FOTT,E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhand-
lung, Stuttgart (1969)

GELPI E., SCHNEIDER H., MANN J., ORO J.:

"Hydrocarbons of geochemical significance in
microscopic Algae"

Phytochem. Vol.9, 603(1970)

GRIMME L.H. and BOARDMAN N.K.:

"Photochemical Activities of a Particle Fraction
P₁ obtained from the Green Alga *Chlorella fusca*"

Biochem.and Biophys.Res.Comm.,Vol.49,No6,1617(1972)

HARBORNE J.B.:

"Phytochemical Methods"

Chapman and Hall, London (1973)

HELLMANN V.:

"Die Basenzusammensetzung der DNS der Grünalge
Chlorella"

Dissertation an der Universität Erlangen-Nürnberg(1973)

HELLMANN V. und KESSLER E.:

"Physiologische und biochemische Beiträge zur
Taxonomie der Gattung *Chlorella*. VIII.Die Basen-
zusammensetzung der DNS"

Arch. Mikrobiol. 95, 311(1974)

IWATA I., NAKATA H., MIZUSHIMA M. and SAKURAI Y.:

"Lipids of Algae. Part I: The Components of
Unsaponifiable Matter of the Algae *Scenedesmus*"

Agr.Biol.Chem.,Vol.25,No.4,319(1961)

IWATA I. and SAKURAI Y.:

"Lipids of Algae. Part III: The Components of
Unsaponifiable Matter of the Algae *Chlorella*"

Agr.Biol.Chem.,Vol.27,No.4,253(1963)

KAISER R.: "Chromatographie in der Gasphase"

B.J.Hochschultaschenbücher, Bibliographisches
Institut Mannheim, Band 1 bis 4 (1965-1973)

KERSCH D.: "Produktivität von Fermenterkulturen der Grün-
alge *Ankistrodesmus braunii* unter autotrophen
Standardbedingungen"

Dipl.-Arbeit an der Universität Erlangen-Nürnberg(1972)

KESSLER E. and SOEDER C.J.:

"Biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*"
Nature 194, 1096 (1962)

KESSLER E., LANGNER W., LUDEWIG J. und WIECHMANN H.:

"Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoffmangel und Hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. In: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*"
Tokyo (1963)

KESSLER E.: "Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. III. Merkmale von 8 autotrophen Arten."
Arch. Mikrobiol. 55, 346 (1967)

KESSLER E., CZYGAN F.C., FOTT B., NOVAKOVA M.:
"Über *Halochlorella rubescens* Dangeard"
Arch. Protistenk. 110, 462 (1968)

KESSLER E. und CZYGAN F.C.:

"Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen."
Arch. Mikrobiol. 70, 211 (1970)

KESSLER E. und ZWEIER I.:

"Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. V. Die auxotrophen und mesotrophen Arten"
Arch. Mikrobiol. 79, 44 (1971)

KESSLER E.: "Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. VII. Die Thermophilie von *Chlorella vulgaris* f. *tertia* Fott et Novakova"
Arch. Mikrobiol. 87, 243 (1972)

KESSLER E.: "Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. IX. Salzresistenz als taxonomisches Merkmal"
Arch. Mikrobiol. 100, 51 (1974)

KOLATTUKUDY P.E.:

"Plant Waxes"

Lipids, Vol.5, No.2, 259 (1969)

KUHL A. and LORENZEN H.:

"Handling and culturing of Chlorella. In: Methods in Cell Physiology"

(D.M.Prescott, ed.), Vol.1, 159 Acad. Press N.Y. (1964)

LIERSCH R.: "Über das ätherische Öl von Grünalgen. I. Die Öle der Gattung Chlorella"

Arch. Mikrobiol. 107, 353 (1976)

NORDBY H. and NAGY S.:

"The relationship of long-chain Hydrocarbons to the chemotaxonomie of Citrus"

Proc. Florida State Hort. Soc. Vol.87, 70 (1974)

PORRA R.J. and GRIMME L.H.:

"The Regulation of Chlorophyll Formation in Chlorella fusca and a new Assay for Chlorophylls a and b"

Enzyme 16, 115 (1973)

SCHNEIDER H., GELPI E., BENNETT E.O., ORO J.:

"Fatty acids of geochemical significance in microscopic Algae"

Phytochem. Vol.9, 613 (1970)

SEIBL J.: "Massenspektrometrie"

Akad. Verlagsges. Frankfurt/Main (1974)

SHIHIRA I. and KRAUSS R.W.:

"Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates"

Coll. Park, Maryland: University of Maryland (1965)

STAHL E. und YORK H.:

"Dünnschichtchromatographie. (Ed. E.Stahl)"

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1967)

STENHAGEN E., ABRAHAMSSON S. and McLAFFERTY F.W. (Ed.):

"Registry of Mass spectral Data"

J.Wiley and Sons, New York (1974)

STRANSKY K., STREIBL M. and HEROUT V.:

"On natural Waxes. VI. Distribution of Wax
Hydrocarbons in Plants at different evolutionary Levels"
Coll.Czech.Chem.Comm., Vol.32, 3213 (1967)

STRANSKY K., STREIBL M. and SORM F.:

"On natural Waxes. VII. Lipid hydrocarbons of
the Alga *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) Bréb."
Coll.Czech.Chem.Comm., Vol.33, 416 (1968)

VELEV T., DIKOV W.C., ZOLOTOVITCH G.D.:

"Content of Hydrocarbons in green Freshwater
Unicellular Algae"
Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences,
Tome 25, No.12, 1677 (1972)

VELEV T.: "Isolierung, Trennung und Identifizierung der
Komponenten der aus Grünalgen gewonnenen Konkrete"
Dissertation, Sofia (1973)

VINAYAKUMAR M. and KESSLER E.:

"Physiological and Biochemical Contributions to
the Taxonomy of the Genus *Chlorella*.
X. Products of Glucose Fermentation"
Arch. Mikrobiol. 103, 13 (1975)

WOOD B.J.B.: "Fatty acids and saponifiable Lipids. In:

Algal Physiology and Biochemistry"
Ed. Stewart, Blackwell Scientific Publications
Oxford 236 (1974)

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Professor Dr. E.Kessler am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und wurde zum Teil aus Mitteln des BMFT-Projektes "Inhaltsstoffe in Algen" finanziert.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. E.Kessler danke ich für die Übertragung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. C.G.Arnold, Herrn Dr. O.Schimmer und Herrn Apotheker Gebhard danke ich für die freundliche Genehmigung, am Gaschromatographen arbeiten zu dürfen.

Herr Dr. O.Vostrowsky vom Institut für organische Chemie II ermöglichte mir in dankenswerter Weise die Aufnahme der Massenspektren und war mir bei deren Auswertung behilflich.

Frl. E.Lechner, die mir ein Jahr lang hilfreich zur Seite stand, möchte ich für ihre gewissenhafte Mitarbeit danken.

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gebührt Dank für die finanzielle Förderung der Arbeit.

Meiner lieben Frau danke ich für die Niederschrift des Manuskriptes.

Lebenslauf

22. Mai 1941 geboren in Bukarest/Rumänien als Sohn des
Verwaltungsjuristen Leopold Kersch und
seiner Ehefrau Elfriede, geb. Frank
- 1948 bis 1952 Besuch der Volksschule in Uttigkofen,
Krs. Vilshofen und Rottweil
- März 1959 Abschluß der Mittelschule Uelzen
- Februar 1963 Reifeprüfung am Leibniz-Gymnasium Rottweil
- April 1963 bis
- März 1965 Wehrdienst und Entlassung als Lt. d. R.
- 1965 Studium der Fächer Biologie und Chemie an
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg
- 1969 Heirat mit Frl. Brigitte Stemmler
- 1970 Diplom-Biologen-Vorprüfung
- 1971 Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt
an Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie
- 1972 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
- 1973 bis 1975 Beteiligung am BMFT-Projekt "Inhaltsstoffe
in Algen"

Buchdruck - Offsetdruck

Karl Döres, 852 Erlangen, Jägerstr. 3 • Tel. 2 15 21